

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

COMMUNICATION OF
INTERNATIONAL APPLICATIONS

(PCT Article 20)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as designated Office

Date of mailing:

14 July 2000 (14.07.00)

The International Bureau transmits herewith copies of the international applications having the following international application numbers and international publication numbers:

International application no.:

PCT/JP99/07337

International publication no.:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

2784
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 2601 WO0P	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/07337	International filing date (day/month/year) 27 December 1999 (27.12.99)	Priority date (day/month/year) 28 December 1998 (28.12.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/16, C07K 14/68, 7/08, A61K 45/00, A61P 3/04, 3/10, 15/06		
Applicant MORI, Masaaki		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☒ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 28 April 2000 (28.04.00)	Date of completion of this report 15 August 2000 (15.08.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

I ional application No.
PCT/JP99/07337

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/07337

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1 to 12

The inventions described in claims 1 to 12 appear to have novelty over the documents cited in the ISR.

None of the documents cited in the ISR describe a screening method for compounds that change the affinity between melanin-concentrating hormone and SLC-1 and a protein having the amino acid sequence represented by sequence no. 11 in this application, nor would this point be easily conceived of by a party skilled in the art.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/07337

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No. Patent No.	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO,99/28492,A1 [PX]	10 June 1999 (10.06.1999)	02 December 1998 (02.12.1998)	03 December 1997 (03.12.1997)

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure	Date of non-written disclosure (day/month/year)	Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)

REC'D 12 SEP 2000

WIPO

PCT

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 2601WOOP	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/07337	国際出願日 (日.月.年) 27.12.99	優先日 (日.月.年) 28.12.98
国際特許分類(IPC) Int.Cl ⁷ C12N 15/16, C07K 14/68, C07K7/08, A61K 45/00, A61P 3/04, A61P 3/10, A61P15/06		
出願人(氏名又は名称) 森 正明		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☒ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 28.04.00	国際予備審査報告を作成した日 15.08.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 富永 みどり 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 N 9152

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | |
|-------------------------------------|----------------|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | PCT 19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☒ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
W0, 99/28492, A1 「PX」	10. 06. 99	02. 12. 98	03. 12. 97

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-12 有
請求の範囲 無

進歩性(IS)

請求の範囲 1-12 有
請求の範囲 無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1-12 有
請求の範囲 無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-12

請求の範囲1-12に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献に対して進歩性を有する。

国際調査報告で引用されたいずれの文献にも、メラニン凝集ホルモンとSLC-1との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法及び、本願の配列番号11で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質が記載されておらず、しかも、その点は当業者といえども容易に想到し得ないものである。



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 2601WOOP	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/07337	国際出願日 (日.月.年) 27.12.99	優先日 (日.月.年) 28.12.98
出願人 (氏名又は名称) 森 正明		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☒ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/16, C07K 14/68, C07K7/08, A61K 45/00, A61P 3/04, A61P 3/10, A61P15/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/16, C07K 14/68, C07K7/08, A61K 45/00, A61P 3/04, A61P 3/10, A61P15/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), SWissProt/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Yukiko Shimomura, et al. "Isolation and Identification of Melanin-Concentrating Hormone as the Endogenous Ligand of the SLC-1 Receptor", Biochemical and Biophysical Research Communications (Aug. 1999), Vol. 261, No. 3, p. 622-626	1-12
PX PA	WO, 99/28492, A1 (Smithkline Beecham Co.) 10. 6月. 1999 (10. 06. 99) (ファミリーなし)	1-11 12
A	EP, 848060, A2 (Smithkline Beecham Co.) 17. 6月. 1998 (17. 06. 98) & JP, 10-262687, A & CA, 2224131, A	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 04. 00

国際調査報告の発送日

18.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり



4 N

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Bernard Lakaye, et al. "Cloning of the rat brain cDNA encoding for the SLC-1 G protein-coupled receptor reveals the presence of an intron in the gene", Biochimica et Biophys Acta (Feb. 1998), Vol. 1401, No. 2, p. 216-220	1-10
A	Lee F. Kolalowski, et al. "Characterization of a human gene related to genes incoding somatostatin reseptors", FEBS Letters (1996), Vol. 398, p. 253-258	1-10
A	WO, 96/18651, A1 (Smithkline Beecham Co.) 20. 6月. 1996 (20. 06. 96) & US, 6008012, A & EP, 871669, A1 & JP, 10-511936, A	1-10
A X	J. L. NAHON, et al. "The Rar Melanin-Concentrationg Hormone Messenger Ribonucleic Acid Encodes Multiple Putative Neuropeptides Coexpressed in the Dorsolateral Hypothalamus", Endocrinology (1989), Vol. 125, No. 4, p. 2056-2065	1-10, 12 11
A X	J. M. VAUGHAN, et al. "Characterization of Melanin-Concentrating Hormone from Rat Hypothalamus", Endocrinology (1989), Vol. 125, No. 3, p. 1660-1665	1-10, 12 11
A X	Robert C., et al. "Nucleotide Sequence and Tissue-Specific Expression of the Rat Melanin Concentrating Hormone Gene", DNA and CELL BIOLOGY (1990), Vol. 9, No. 9, p. 637-645	1-10, 12 11
A X	Christophe Bereton, et al. "Isolation and Characterization of the Human Melanin-Concentrating Hormone Gene and Variant Gene", Molecular Brain Research (1993), Vol. 18, No. 4, p. 297-310	1-10, 12 11

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

REC'D 25 APR 2000

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 2601WOOP	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/07337	国際出願日 (日.月.年) 27.12.99	優先日 (日.月.年) 28.12.98
出願人(氏名又は名称) 森 正明		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☒ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 15/16, C07K 14/68, C07K7/08, A61K 45/00, A61P 3/04, A61P 3/10, A61P15/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 15/16, C07K 14/68, C07K7/08, A61K 45/00, A61P 3/04, A61P 3/10, A61P15/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), SWwissProt/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Yukiko Shimomura, et al. "Isolation and Identification of Melanin-Concentrating Hormone as the Endogenous Ligand of the SLC-1 Receptor", Biochemical and Biophysical Research Communications (Aug. 1999), Vol. 261, No. 3, p. 622-626	1-12
PX PA	WO, 99/28492, A1 (Smithkline Beecham Co.) 10. 6月. 1999 (10. 06. 99) (ファミリーなし)	1-11 12
A	EP, 848060, A2 (Smithkline Beecham Co.) 17. 6月. 1998 (17. 06. 98) & JP, 10-262687, A & CA, 2224131, A	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 04. 00

国際調査報告の発送日

18.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

印

4 N

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Bernard Lakaye, et al. "Cloning of the rat brain cDNA encoding for the SLC-1 G protein-coupled receptor reveals the presence of an intron in the gene", Biochimica et Biophys Acta (Feb. 1998), Vol. 1401, No. 2, p. 216-220	1-10
A	Lee F. Kolalowski, et al. "Characterization of a human gene related to genes incoding somatostatin reseptors", FEBS Letters (1996), Vol. 398, p. 253-258	1-10
A	WO, 96/18651, A1 (Smithkline Beecham Co.) 20. 6月. 1996 (20. 06. 96) & US, 6008012, A & EP, 871669, A1 & JP, 10-511936, A	1-10
A X	J. L. NAHON, et al. "The Rar Melanin-Concentrationg Hormone Messenger Ribonucleic Acid Encodes Multiple Putative Neuropeptides Coexpressed in the Dorsolateral Hypothalamus", Endocrinology (1989), Vol. 125, No. 4, p. 2056-2065	1-10, 12 11
A X	J. M. VAUGHAN, et al. "Characterization of Melanin-Concentrating Hormone from Rat Hypothalamus", Endocrinology (1989), Vol. 125, No. 3, p. 1660-1665	1-10, 12 11
A X	Robert C., et al. "Nucleotide Sequence and Tissue-Specific Expression of the Rat Melanin Concentrating Hormone Gene", DNA and CELL BIOLOGY (1990), Vol. 9, No. 9, p. 637-645	1-10, 12 11
A X	Christophe Bereton, et al. "Isolation and Characterization of the Human Melanin-Concentrating Hormone Gene and Variant Gene", Molecular Brain Research (1993), Vol. 18, No. 4, p. 297-310	1-10, 12 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/07337

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N 15/16, C07K 14/68, C07K7/08, A61K 45/00, A61P 3/04, A61P 3/10, A61P15/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N 15/16, C07K 14/68, C07K7/08, A61K 45/00, A61P 3/04, A61P 3/10, A61P15/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), SWISSProt/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Yukiko Shimomura, et al. "Isolation and Identification of Melanin-Concentrating Hormone as the Endogenous Ligand of the SLC-1 Receptor", Biochemical and Biophysical Research Communications (Aug.1999), Vol.261, No.3, p.622-626	1-12
PX PA	WO, 99/28492, A1 (Smithkline Beecham Co.), 10 June, 1999 (10.06.99) (Family: none)	1-11 12
A	EP, 848060, A2 (Smithkline Beecham Co.), 17 June, 1998 (17.06.98) & JP, 10-262687, A & CA, 2224131, A	1-10
A	Bernard Lakaye, et al. "Cloning of the rat brain cDNA encoding for the SLC-1 G protein-coupled receptor reveals the presence of an intron in the gene", Biochimica et Biophys Acta (Feb.1998), Vol.1401, No.2, p.216-220	1-10
A	Lee F. Kolalowski, et al. "Characterization of a human gene related to genes encoding somatostatin receptors", FEBS Letters (1996), Vol.398, p.253-258	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
04 April, 2000 (04.04.00)

Date of mailing of the international search report
18 April, 2000 (18.04.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/07337

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 96/18651, A1 (Smithkline Beecham Co.), 20 June, 1996 (20.06.96) & US, 6008012, A & EP, 871669, A1 & JP, 10-511936, A	1-10
A X	J.L.NAHON, et al. "The Rar Melanin-Concentrationg Hormone Messenger Ribonucleic Acid Encodes Multiple Putative Neuropeptides Coexpressed in the Dorsolateral Hypothalamus", Endocrinology (1989), Vol.125, No.4, p.2056-2065	1-10,12 11
A X	J. M. VAUGHAN, et al., "Characterization of Melanin-Concentrating Hormone from Rat Hypothalamus", Endocrinology (1989), Vol.125, No.3, p.1660-1665	1-10,12 11
A X	Robert C., et al. "Nucleotide Sequence and Tissue-Specific Expression of the Rat Melanin Concentrating Hormone Gene", DNA and CELL BIOLOGY (1990), Vol.9, No.9, p.637-645	1-10,12 11
A X	Christophe Bereton, et al. "Isolation and Characterization of the Human Melanin-Concentrating Hormone Gene and Variant Gene", Molecular Brain Research (1993), Vol.18, No.4, p.297-310	1-10,12 11

記録原本

特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号 官庁記入欄

PCT/J 107337

国際出願日 27.12.99

(受付印) PCT International Application
日本国特許庁

出願人又は代理人の書類記号
(希望する場合、最大12字)

2601WO0P

第I欄 発明の名称

スクリーニング方法

第II欄 出願人

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

森 正明 MORI Masaaki ✓
〒305-0821 日本国茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日
ハイツ702号
Takeda Kasuga Haitzu 702, 7-9, Kasuga 1-chome, Tsukuba-shi,
IBARAKI 305-0821 JAPAN

☒ この欄に記載した者は、
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍(国名): 日本国 Japan

住所(国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:

☒ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

第III欄 その他の出願人又は発明者

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

下村 行生 SHIMOMURA Yukio ✓
〒305-0035 日本国茨城県つくば市松代3丁目12番地1 武田薬品松代
レジデンス605号
Takeda Yakuhin Matsushiro Rezidensu 605, 12-1, Matsushiro 3-chome,
Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0035 JAPAN

この欄に記載した者は、
次に該当する:

☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 Japan

住所(国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:

☒ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続葉に記載されている。

第IV欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人 ☐ 共通の代表者

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

11404 弁理士 高橋秀一 TAKAHASHI Shuichi
〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内
c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi,
OSAKA 532-0024 JAPAN

電話番号:

03-3278-2235

ファクシミリ番号:

03-3278-2222

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

第Ⅲ欄の続き その他の出願人又は発明者

この続葉を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)
 竹河 志郎 TAKEKAWA Shiro ✓
 〒305-0045 日本国茨城県つくば市梅園2丁目5番地3 梅園スク
 エアB棟305号
 Umezono Square B-305, 5-3, Umezono 2-chome, Tsukuba-shi,
 IBARAKI 305-0045 JAPAN

この欄に記載した者は、
次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
 (ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である: ☒ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)
 周郷 司 SUGO Tsukasa ✓
 〒300-3261 日本国茨城県つくば市花畑2丁目7番地26 テクノタウン
 筑波301号
 Technotown Tsukuba 301, 7-26, Hanabatake 2-chome, Tsukuba-shi,
 IBARAKI 305-3261 JAPAN

この欄に記載した者は、
次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
 (ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である: ☒ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)
 石橋 祥弘 ISHIBASHI Yoshihiro ✓
 〒305-0003 日本国茨城県つくば市桜2丁目25番地1
 25-1, Sakura 2-chome, Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0003
 JAPAN

この欄に記載した者は、
次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
 (ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である: ☒ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)
 北田 千恵子 KITADA Chieko ✓
 〒590-0073 日本国大阪府堺市南向陽町1丁2番8号
 2-8, Minamikoyochō 1-cho, Sakai-shi, OSAKA 590-0073 JAPAN

この欄に記載した者は、
次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
 (ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である: ☒ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が他の続葉に記載されている。

第Ⅲ欄の続き その他の出願人又は発明者

この続葉を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

鈴木 伸宏 SUZUKI Nobuhiro
〒305-0861 日本国茨城県つくば市大字谷田部1077番地50
1077-50, Oaza Yatabe, Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0861 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☒ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☐ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名):

住所 (国名):

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☐ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名):

住所 (国名):

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☐ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名):

住所 (国名):

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☐ その他の出願人又は発明者が他の続葉に記載されている。

第Ⅴ欄 国の指定

規則 4. 9(a)の規定に基づき次の指定を行う（該当する□にレ印を付すこと；少なくとも1つの□にレ印を付すこと）。

広域特許

- ☐ AP ARIPO特許：GH ガーナ Ghana, GM ガンビア Gambia, KE ケニア Kenya, LS レソト Lesotho, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, SZ スワジランド Swaziland, UG ウガンダ Uganda, ZW ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国
- ☐ EA ユーラシア特許：AM アルメニア Armenia, AZ アゼルバイジャン Azerbaijan, BY ベラルーシ Belarus, KG キルギス Kyrgyzstan, KZ カザフスタン Kazakhstan, MD モルドヴァ Republic of Moldova, RU ロシア Russian Federation, TJ タジキスタン Tajikistan, TM トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☐ EP ヨーロッパ特許：AT オーストリア Austria, BE ベルギー Belgium, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CY キプロス Cyprus, DE ドイツ Germany, DK デンマーク Denmark, ES スペイン Spain, FI フィンランド Finland, FR フランス France, GB 英国 United Kingdom, GR ギリシャ Greece, IE アイルランド Ireland, IT イタリア Italy, LU ルクセンブルグ Luxembourg, MC モナコ Monaco, NL オランダ Netherlands, PT ポルトガル Portugal, SE スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☐ OA OAPI特許：BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI コートジボアール Côte d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, GW ギニア・ビサウ Guinea-Bissau, ML マリ Mali, MR モーリタニア Mauritania, NE ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャード Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締約国である他の国（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

国内特許（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AE アラブ首長国連邦 United Arab Emirates | <input type="checkbox"/> MD モルドヴァ Republic of Moldova |
| <input type="checkbox"/> AL アルバニア Albania | <input type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar |
| <input type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia | <input type="checkbox"/> MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> AT オーストリア Austria | <input type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia |
| <input type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia | <input type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi |
| <input type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan | <input type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico |
| <input type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina | <input type="checkbox"/> NO ノールウェー Norway |
| <input type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados | <input type="checkbox"/> NZ ニュー・ジーランド New Zealand |
| <input type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria | <input type="checkbox"/> PL ポーランド Poland |
| <input type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil | <input type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal |
| <input type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus | <input type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania |
| <input type="checkbox"/> CA カナダ Canada | <input type="checkbox"/> RU ロシア Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> SD スーダン Sudan |
| <input type="checkbox"/> CN 中国 China | <input type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden |
| <input type="checkbox"/> CU キューバ Cuba | <input type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore |
| <input type="checkbox"/> CZ チェッコ Czech Republic | <input type="checkbox"/> SI スロヴェニア Slovenia |
| <input type="checkbox"/> DE ドイツ Germany | <input type="checkbox"/> SK スロヴァキア Slovakia |
| <input type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark | <input type="checkbox"/> SL シエラ・レオネ Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> EE エストニア Estonia | <input type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> ES スペイン Spain | <input type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> FI フィンランド Finland | <input type="checkbox"/> TR トルコ Turkey |
| <input type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom | <input type="checkbox"/> TT トリニダッド・トバゴ Trinidad and Tobago |
| <input type="checkbox"/> GD グレナダ Grenada | <input type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine |
| <input type="checkbox"/> GE グルジア Georgia | <input type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda |
| <input type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> US 米国 United States of America |
| <input type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia | <input type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan |
| <input type="checkbox"/> HR クロアチア Croatia | <input type="checkbox"/> VN ヴィエトナム Viet Nam |
| <input type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary | <input type="checkbox"/> YU ユーゴスラヴィア Yugoslavia |
| <input type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia | <input type="checkbox"/> ZA 南アフリカ共和国 South Africa |
| <input type="checkbox"/> IL イスラエル Israel | <input type="checkbox"/> ZW ジンバブエ Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> IN インド India | |
| <input type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland | |
| <input type="checkbox"/> JP 日本 Japan | |
| <input type="checkbox"/> KE ケニア Kenya | |
| <input type="checkbox"/> KG キルギス Kyrgyzstan | |
| <input type="checkbox"/> KP 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KR 韓国 Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ カザフスタン Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC セント・ルシア Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK スリ・ランカ Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR リベリア Liberia | |
| <input type="checkbox"/> LS レソト Lesotho | |
| <input type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania | |
| <input type="checkbox"/> LU ルクセンブルグ Luxembourg | |
| <input type="checkbox"/> LV ラトヴィア Latvia | |

以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定（国内特許のために）するためのものである

- ☐ _____
- ☐ _____
- ☐ _____
- ☐ _____
- ☐ _____

確認の指定の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則4. 9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。（指定の確認は、指定を特定する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。）

追記欄

この追記欄を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

1. 全ての情報を該当する欄の中に記載できないとき。

この場合は、「第何欄.....の続き」(欄番号を表示する)と表示し、記載できない欄の指示と同じ方法で情報を記載する。；特に、

(i) 出願人又は発明者として3人以上いる場合で、「続葉」を使用できないとき。

この場合は、「第Ⅲ欄の続き」と表示し、第Ⅲ欄で求められている同じ情報を、それぞれの者について記載する。

(ii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、「追記欄に記載した指定国」にレ印を付しいるとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」と記載し、該当する出願人の氏名(名称)を表示し、それぞれの氏名(名称)の次にその者が出願人となる指定国(広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。

(iii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、発明者又は発明者及び出願人である者が、すべての指定国のための又は米国のための発明者ではないとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」と記載し、該当する発明者の氏名を表示し、その者が発明者である指定国(広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。

(iv) 第Ⅳ欄に示す代理人以外に代理人がいるとき。

この場合は、「第Ⅳ欄の続き」と表示し、第Ⅳ欄で求められている同じ情報を、それぞれの代理人について記載する。

(v) 第Ⅴ欄において指定国又はOAPI特許が、「追加特許」又は「追加証」を伴うとき、又は、米国が「継続」又は「一部継続」を伴うとき。

この場合は、「第Ⅴ欄の続き」及び該当するそれぞれの指定国又はOAPI特許を表示し、それぞれの指定国又はOAPI特許の後に、原特許又は原出願の番号及び特許付与日又は原出願日を記載する。

(vi) 第Ⅵ欄において優先権を主張する先の出願が4件以上あるとき。

この場合は、「第Ⅵ欄の続き」と表示し、第Ⅵ欄で求められている同じ情報を、それぞれの先の出願について記載する。

(vii) 第Ⅵ欄において先の出願がARIPOの特許出願であるとき。

この場合は、「第Ⅵ欄の続き」と表示し、その先の出願に対応する項目の番号を特定して、更に、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を表示する。

2. 出願人が、第Ⅴ欄における確認の指定の宣言に関し、その宣言からいずれかの国を除くことを希望するとき。

この場合は、「確認の指定の宣言から、以下の指定国を除く」と記載し、除かれる国名又は2文字の国コードを表示する。

3. 出願人が、指定官庁について不利にならない開示又は新規性の喪失についての例外に関する国内法の適用を請求するとき。

この場合は、「不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する陳述」と表示し、以下にその内容を記述する。

「第Ⅳ欄の続き」

11045 弁理士 内山 務 UCHIYAMA Tsutomu

〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内

c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi,
OSAKA 532-0024 JAPAN

第VI欄 優先権主張

この優先権の主張(先の出願)が追記欄に記載されて

先の出願日 (日. 月. 年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願 : 国 名	広域出願 : *広域官庁名	国際出願 : 受理官庁名
(1) 28. 12. 98	平成10年特許願 第374454号	日本国 Japan		
(2) 28. 04. 99	平成11年特許願 第122688号	日本国 Japan		
(3) 02. 09. 99	平成11年特許願 第249300号	日本国 Japan		

☒ 上記 () の番号の先の出願(ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限り)のうち、次の () の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁 (日本国特許庁の長官) に対して請求している。 (1), (2), (3)

*先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない(規則4.10(b)(ii))。追記欄を参照。

第VII欄 国際調査機関

国際調査機関 (ISA) の選択

先の調査結果の利用請求; 当該調査の照会
(先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合)

ISA/JP

出願日 (日. 月. 年)

出願番号

国名 (又は広域官庁)

第VIII欄 照合欄 ; 出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書 6 枚
明細書 (配列表を除く) 99 枚
請求の範囲 2 枚
要約書 1 枚
図面 10 枚
明細書の配列表 15 枚
合計 133 枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

- ☒ 手数料計算用紙
- ☐ 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
- ☐ 国際事務局の口座への振込みを証明する書面
- ☒ 別個の記名押印された委任状
- ☐ 包括委任状の写し
- ☐ 記名押印 (署名) の説明書
- ☐ 優先権書類 (上記第VI欄の () の番号を記載する):
- ☐ 国際出願の翻訳文 (翻訳に使用した言語名を記載する):
- ☐ 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面
- ☐ ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列表 (フレキシブルディスク)
- ☐ その他 (書類名を詳細に記載する)

要約書とともに提示する 図面:

本国際出願の使用言語名: 日本語

第IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

高橋 秀一



内山 務



受理官庁記入欄

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日

27.12.99

3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であつて、その後期間内に提出されたものの実際の受理の日 (訂正日)

4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日

5. 出願人により特定された国際調査機関

ISA/JP

6. ☒ 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない

2. 図面

☐ 受理された

☐ 不足図面がある

国際事務局記入欄

14 JAN 2000

(14. 01. 00)

記録原本の受理の日

振込みを証明する書面

お手続日 12 年 4 月 9 日		振込金受取書 (兼振込手数料受取書)		お振込方法	住友本支店宛	他行宛 電信扱
お振込先	フリガナ トウキョウ	はじめてから五文字ご記入ください。	フリガナ ウチサカイ	はじめてから五文字ご記入ください。	預金種目 9	1.普通 4.貯蓄 2.当座 9.その他 非居住者円普通預金
お振込先	東京三菱 銀行		内幸町 支店		口座番号	0473286
お振込先	フリガナ ワイポーピーシーディー、ジュネーブ		金 額			右つめてご記入ください。
お振込先	WIPO-PCT, Geneva様					
お振込先	フリガナ タケダヤクヒンコウギョウカブシキガイシャ					
お振込先	武田薬品工業株式会社 様					
お振込先	東京都中央区日本橋二丁目12番10号					
お振込先	(ご連絡先お電話) (03-3258-2225)					

○振込依頼書に記載相違等の不備があった場合には、照会等のために振り込みが遅延することがあります。
○通信機器、回線の障害または郵便物の遅延等やむを得ない事由によって振り込みが遅延することもありますのでご了承ください。

消費税込手数料額

株式会社 住友銀行 東京営業部

当行本支店への振り込みのために受け入れた上記の小切手等が不渡りとなったときは、その金額の振り込みを取り消し、その小切手等は権利保全の手続きをしないで当店において返却します。また、振込規定を店頭に備え付けておりますので、必要の方はお申し出ください。なお裏面に抜粋を掲載しております。

このたびは住友銀行をご利用いただきまして、誠にありがとうございました。
今後とも引き続きお引き立て賜いますよう、お願い申し上げます。
お振り込みは早くて便利な自動サービス機をご利用ください。
現金でのお振り込みは、平日 午後6時までお取り扱いいたします。
キャッシュカードでのお振り込みは、平日6時以降、土・日曜日、祝日もお取り扱いいたします。(一部店舗を除く)

(現金・小切手)

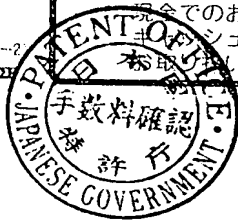
印紙200円

振込金手数料が

2万円未満非課税

(振込金額・印紙額)

印課税



取扱手数料

16,500円

28,040.00

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

高橋 秀一

あて名

7532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社知的財産部

PCT/JP99/07337

RO 105

發送日 (日. 月. 年)

1 1 . 0 1 . 0 0

出願人又は代理人

の書類記号

2601WOOP

國際出願番号

PCT/J P 99/07337

國際出願日 (日. 月. 年)

27. 12. 99

優先日 (日, 月, 年)

28. 12. 98

出願人 (氏名又は名称)

森 正明

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、 11 日 01 月 00 年 に国際事務局に送付した。

注 意

- a. 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード（日本の場合JP）、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- b. 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- c. あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- d. 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- e. この通知に記載された出願人のあて名、氏名（名称）に誤りがあるときは申出により訂正します。
- f. 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知（様式PCT/IB/301）する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁 (RO/JP)

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/105 (1998年7月)

権限のある職員

特許庁長官

担当者	G・M	Pat・M	郵長
特許	協	力	条
約			

発信人 日本国特許庁 (国際調査機関)

出願人代理人
高橋 秀一 殿
あて名
〒 532-0024
大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内

00.6.18

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨の決定の送付の通知書

(法施行規則第41条)
[PCT規則44.1]



発送日 (日.月.年) 18.04.00

出願人又は代理人
の書類記号 2601WOOP

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号
PCT/JP99/07337

国際出願日 (日.月.年) 27.12.99

出願人 (氏名又は名称)
森 正明

- ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出
出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる (PCT規則46参照)。
いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。
詳細については添付用紙の備考を参照すること。
どこへ 直接次の場所へ
The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No.: (41-22)740.14.35
詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。
- ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項 (PCT17条(2)(a)) の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
- ☐ 法施行規則第44条 (PCT規則40.2) に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。
☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。
☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。
- 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。
優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。
出願人が優先日から30月まで (官庁によってはもっと遅く) 国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。
国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員
特許庁長官
4N 9152
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

注 意

1. 国際調査報告の発送日から起算する条約第19条(1)及び規則46.1に従う国際事務局への補正期間に注意してください。
2. 条約22条(2)に規定する期間に注意してください。
3. 文献の写しの請求について

国際調査報告に記載した文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することもできますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許(実用新案・意匠)公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号(又は特許番号、登録番号)

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際調査報告の写しを添付してください(返却します)。

〔申込み及び照会先〕

〒135 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ダイヤビル
財団法人 日本特許情報機構 サービス課
TEL 03-5690-3900

注意 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

様式PCT/ISA/220の備考

この備考は、PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手続においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT 19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

補正の対象となるもの

PCT 19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。

国際段階においてPCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続きにおいて請求の範囲を（更に）補正することができる。

明細書及び図面は、PCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続においてのみ補正することができる。

国内段階に移行する際、PCT 28条（又はPCT 41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を提出した／する場合については、以下を参照すること。

どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。

差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。

差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直すなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。

補正は国際公開の言語で行う。

補正書にどのような書類を添付しなければならないか

書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT 19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT 19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。

次に、添付する書簡中での、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合] :
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合] :
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合] :
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は
“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合] :
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”(PCT規則46.4)

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる(明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない)。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならない、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならない、見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性に関して、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関連する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書(及び説明書)を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予備審査機関にも提出することが望ましい(PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照)。詳細は国際予備審査請求書(PCT/IPEA/401)の注意書参照。

国内段階に移行するための国際出願の翻訳に関して

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁/選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁/選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 25 January 2000 (25.01.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 2601WO0P	International application No. PCT/JP99/07337

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

MORI, Masaaki et al (all designated States)

International filing date	:	27 December 1999 (27.12.99)
Priority date(s) claimed	:	28 December 1998 (28.12.98)
		28 April 1999 (28.04.99)
		02 September 1999 (02.09.99)

Date of receipt of the record copy by the International Bureau	:	14 January 2000 (14.01.00)
---	---	----------------------------

List of designated Offices	:	
----------------------------	---	--

National :US

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
- ☒ confirmation of precautionary designations
- ☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

Masashi HONDA

Telephone No. (41-22) 338.83.38

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 29 February 2000 (29.02.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 2601WOOP	
International application No. PCT/JP99/07337	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
Applicant MORI, Masaaki et al	International filing date (day/month/year) 27 December 1999 (27.12.99) Priority date (day/month/year) 28 December 1998 (28.12.98)

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
28 Dec 1998 (28.12.98)	10/374454	JP	18 Febr 2000 (18.02.00)
28 Apr 1999 (28.04.99)	11/122688	JP	18 Febr 2000 (18.02.00)
02 Sept 1999 (02.09.99)	11/249300	JP	18 Febr 2000 (18.02.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Marc Salzmann

Telephone No. (41-22) 338.83.38

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON


Date of mailing (day/month/year) 14 July 2000 (14.07.00)		
Applicant's or agent's file reference 2601WO0P		
IMPORTANT NOTICE		
International application No. PCT/JP99/07337	International filing date (day/month/year) 27 December 1999 (27.12.99)	Priority date (day/month/year) 28 December 1998 (28.12.98)
Applicant MORI, Masaaki et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
- US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
- None

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

PCT
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 18 January 2001 (18.01.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 2601WO0P	
International application No. PCT/JP99/07337	International filing date (day/month/year) 27 December 1999 (27.12.99)
Applicant MORI, Masaaki et al	

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

None

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Eliott Peretti Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

発信人 日本国特許庁 (国際予備審査機関)

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒 532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内

00.9.18

PCT見解書

(法第13条)
(PCT規則66)

受付

'00.7.19

知的財産部

発送日
(日.月.年)

18.07.00

出願人又は代理人
の書類記号

2601WOOP

応答期間

上記発送日から 2 月以内

国際出願番号

PCT/J P 99/07337

国際出願日

(日.月.年) 27.12.99

優先日

(日.月.年) 28.12.98

国際特許分類 (IPC)

Int. Cl¹ C12N 15/16, C07K 14/68, C07K7/08, A61K 45/00, A61P 3/04, A61P 3/10, A61P15/06

出願人 (氏名又は名称)

森 正明

1. これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。

2. この見解書は、次の内容を含む。

I ☒ 見解の基礎

II ☐ 優先権

III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成

IV ☐ 発明の単一性の欠如

V ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☒ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☐ 国際出願に対する意見

3. 出願人は、この見解書に応答することが求められる。

いつ?

上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限られることに注意されたい。

どのように?

法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。

なお

補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。

補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。

応答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。

4. 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 28.04.01 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4 N

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、
 明細書 第 _____ ページ、
 明細書 第 _____ ページ、
 出願時に提出されたもの
 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、
 請求の範囲 第 _____ 項、
 請求の範囲 第 _____ 項、
 請求の範囲 第 _____ 項、
 出願時に提出されたもの
 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、
 図面 第 _____ ページ/図、
 図面 第 _____ ページ/図、
 出願時に提出されたもの
 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、
 出願時に提出されたもの
 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☒ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条(PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-10, 12

有

請求の範囲

11

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-10, 12

有

請求の範囲

11

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-12

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明

請求の範囲11

文献1: J. L. NAHON, et al. "The Rat Melanin-Concentrating Hormone Messenger Ribonucleic Acid Encodes Multiple Putative Neuropeptides Coexpressed in the Dorsolateral Hypothalamus", Endocrinology(1989), Vol. 125, No. 4, p. 2056-2065

文献2: J. M. VAUGHAN, et al. "Characterization of Melanin-Concentrating Hormone from Rat Hypothalamus", Endocrinology(1989), Vol. 125, No. 3, p. 1660-1665

文献3: Robert C., et al. "Nucleotide Sequence and Tissue-Specific Expression of the Rat Melanin Concentrating Hormone Gene", DNA and CELL BIOLOGY(1990), Vol. 9, No. 9, p. 637-645

文献4: Christophe Bereton, et al. "Isolation and Characterization of the Human Melanin-Concentrating Hormone Gene and Variant Gene", Molecular Brain Research(1993), Vol. 18, No. 4, p. 297-310

文献1～4には、メラニン凝集ホルモン(MCH)が記載されている。文献1～4に記載されているMCHは、本願発明の配列番号2で表されるアミノ酸配列のN末端から第5番目ないし第29番目の配列を含有するものであるから、本願の請求の範囲11に記載の発明と同一である。

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書(PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 99/28492, A1 「PX」	10. 06. 99	02. 12. 98	03. 12. 97

2. 書面による開示以外の開示(PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書(PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
W0, 99/28492, A1 「P X」	10. 06. 99	02. 12. 98	03. 12. 97

2. 書面による開示以外の開示(PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

答 弁 書



特許庁審査官 富永みどり 殿

1. 国際出願の表示 PCT/J P 99/07337

2. 出 願 人

名 称 森 正明
MORI Masaaki

あて名 〒305-0821

日本国茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日
ハイツ702号

Takeda Kasuga Haitsu 702, 7-9, Kasuga 1-chome,
Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0821 JAPAN

国 籍 日本国 J a p a n

住 所 日本国 J a p a n

(他 6名)

3. 代 理 人

氏 名 11404 弁理士 高 橋 秀 一

TAKAHASHI Shuichi

あて名 〒532-0024

日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内

c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi,
OSAKA 532-0024 JAPAN



4. 通知の日付 18. 07. 00

5. 答弁の内容 2000年7月18日付のPCT見解書にご記載の文献1～4には、ご認定のとおり、本願発明の配列番号：2で表されるアミノ酸配列のN末端から第5番目ないし第29番目の配列を含有するMCHが記載されています。一方、本願の請求項11に記載の発明はこれら文献記載のMCHがボルトンハンター試薬によって誘導されたペプチドまたはその塩、より具体的には、明細書第14頁第17行ないし第16頁第2行の(1)～(7)で示されたペプチド性化合物またはその塩に関します。従って、請求項11に記載の発明は、PCT見解書にご記載の文献1～4には全く記載されておらず、新規性を有します。

また、明細書第93-94頁の実施例23などに記載されているように、

これらのペプチド性化合物またはその塩が受容体結合アッセイなどに適していることは、PCT見解書にご記載の文献1～4には全く記載も示唆もされておらず、本願の請求項11に記載の発明は、PCT見解書にご記載の文献1～4から容易に類推できるものではありません。

以 上

担当者	G・M		Pat・M	係長

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒 532-0024
大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

（法施行規則第57条）
【PCT規則71.1】



発送日
（日・月・年）

05.09.00

出願人又は代理人
の書類記号

2601WOOP

重要な通知

国際出願番号

PCT/J P99/07337

国際出願日

（日・月・年） 27.12.99

優先日

（日・月・年） 28.12.98

出願人（氏名又は名称）

森 正明

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。
3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第Ⅱ巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/J P）
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特許庁長官

4N 9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/IPEA/416（1992年7月）

（添付用紙の注意書きを参照）

注 意

1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であつて国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

〔申込み及び照会先〕

〒100 東京都千代田区霞が関3-4-2 商工会館・弁理士会館ビル
財団法人 日本特許情報機構 サービス課
TEL 03-3503-3900

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

- ### 2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）

明 細 書

スクリーニング方法

技術分野

- 5 本発明は、オーファンレセプター蛋白質であるSLC-1 (FEBS Letters 398 (1996) 253-258など) またはその塩とMCH (メラニン凝集ホルモン; Melanin Concentrating Hormone (Endocrinology, vol. 125, 1660-1665 (1989)など) もしくはその誘導体またはその塩を用いることを特徴とする抗肥満薬または食欲調製薬などのスクリーニング方法などに関する。

10

背景技術

- ヒトゲノムから見出されたヒト型SLC-1 (FEBS Letters 398 (1996) 253-258) およびラットの脳のcDNAライブラリーから見出されたラット型SLC-1 (Biochimica et Biophysica Acta 1401 (1998) 216-220) はG蛋白質共役型レセプターあるいは7回膜貫通型レセプターと総称されるものであり、
15 数多くの、リガンドが不明ないわゆるオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質の一種である。

- これらオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドを決定する一般的な手段としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の一次構造上の類似性
20 から推定するしかなかった。しかし、多くのオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質は既知のレセプターとのホモロジーが低いものが多く、実際は既知リガンドのレセプターサブタイプである場合を除いては一次構造上の類似性だけでそのリガンドを推定することは困難であった。一方、遺伝子解析から多くのオーファンG蛋白質共役型レセプターが見つかることから対応する未知
25 のリガンドがまだ数多く存在していることが推定されているが、これまで実

際にオーファンG蛋白質共役型レセプターのリガンドを同定した例は数少なく、SLC-1についてもそのリガンドの存在は報告されていない。

- 5 オーファンレセプター蛋白質であるSLC-1に対するリガンドの探索と、SLC-1およびそのリガンドを用いることを特徴とする化合物などのスクリーニング方法の確立が課題とされている。

発明の開示

- 10 本発明者らは、SLC-1をコードするcDNAを適当な手段で発現させた細胞を用い、特異的な細胞刺激（シグナル伝達）活性の測定等を指標に、該レセプター蛋白質がリガンドとして認識するポリペプチドをスクリーニングすることに成功し、該ポリペプチドがMCH（メラニン凝集ホルモン；Melanin Concentrating Hormone）であることを見出した。

- 15 さらに、本発明者らは、該活性因子であるMCHまたはその塩と上記SLC-1またはその塩との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができることを見いだした。

また、本発明のヒト型SLC-1のアミノ酸配列は、既報（FEBS Letters 398 (1996) 253-258、W0 96/18651号）とは異なる新規な配列であることを見出した。

すなわち、本発明は、

- 20 (1) メラニン凝集ホルモン(MCH)もしくはその誘導体またはその塩およびSLC-1またはその塩を用いることを特徴とするMCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- 25 (2) MCHもしくはその誘導体またはその塩およびSLC-1またはその塩を含有することを特徴とするMCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(3) 上記(1)記載のスクリーニング方法または上記(2)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、MCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩、

(4) 上記(3)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

5 (5) 抗肥満薬である上記(4)記載の化合物またはその塩、

(6) 配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

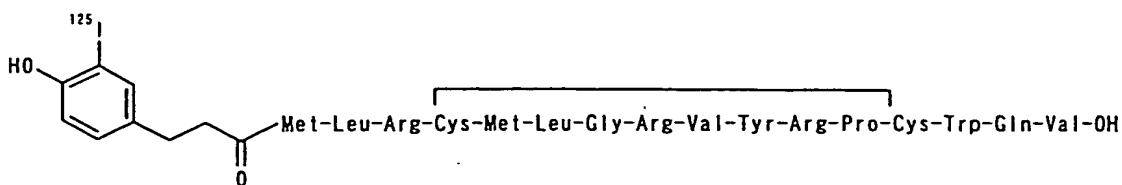
(7) 上記(6)記載のタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

10 (8) MCHが配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドである上記(1)記載のスクリーニング方法または上記(2)記載のスクリーニング用キット、

(9) 誘導体が配列番号：2で表されるアミノ酸配列のN末端から第5番目ないし第19番目の部分配列を含有するペプチドである上記(1)記載のスクリーニング方法または上記(2)記載のスクリーニング用キット、

15 (10) 誘導体がボルトンハンター試薬により誘導されたMCHまたはボルトンハンター試薬により誘導された配列番号：2で表されるアミノ酸配列のN末端から第5番目ないし第19番目の部分配列を含有するペプチドである上記(1)記載のスクリーニング方法または上記(2)記載のスクリーニング用キット、

20 (11) ボルトンハンター試薬により誘導されたMCHまたはボルトンハンター試薬により誘導された配列番号：2で表されるアミノ酸配列のN末端から第5番目ないし第19番目の部分配列を含有するペプチドまたはその塩、および
(12) 式



で表される化合物またはその塩などを提供するものである。

本発明におけるSLC-1に関して、具体的には、上述の公知のSLC-1またはその塩などがあげられるのみならず、

- 5 (13) 配列番号：5または配列番号：11で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするSLC-1またはその塩、または

- (14) 配列番号：5または配列番号：11で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：5または配列番号：11で表わされるアミノ酸配列に1
10 個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が付加した（または挿入された）アミノ酸配列、あるいは配列番号：5または配列番号：11で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有するタンパク質である上記(13)記載のSLC-1またはその塩などがあげられる。
15

また、本発明におけるMCHに関して、具体的には、上述の公知のMCHまたはその塩などがあげられるのみならず、

- (15) 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするMCHもしくはその誘導体または
20 その塩、または

- (16) タンパク質が、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列中の1個以上10個以下、好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列に1個以上10個以下、好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が付加した（または挿入された）アミノ酸配列、

あるいは配列番号：2で表わされるアミノ酸配列中の1個以上10個以下、好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有するペプチドである上記（15）項記載のMCHもしくはその誘導体またはその塩などがあげられる。

5

図面の簡単な説明

図1はラット脳から調製したHPLCフラクションについてCH0/SLC-1細胞特異的なcAMP合成抑制活性を測定した結果を示す。

図2は参考例1中のラット脳HPLCフラクション#34のcAMP合成抑制活性のプロナーゼ処理に対する挙動を示す。

図3は参考例3中のODSカラム（Develosil ODS-UG-3）で精製した画分についてCH0/SLC-1細胞に特異的なcAMP合成抑制活性を測定した結果を示す。

図4はラットSLC-1遺伝子発現CH0細胞株についてin situハイブリダイゼーションによる遺伝子発現量の比較を示す。

図5は種々の濃度のMCHのCH0/SLC-1細胞に対するcAMP合成抑制活性を示す。

図6は種々の濃度のMCHのCH0/SLC-1細胞に対するアラキドン酸代謝物放出活性を示す。

図7はMCH、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、MCH(5-19)、MCH(6-19)およびMCH(7-19)のGTP γ Sバインディングアッセイを用いたアゴニスト活性を測定した結果を示す。

図8は非アイソトープボルトナーハンター試薬によって誘導体化されたMCH、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)およびMCH(5-19)のGTP γ Sバインディングアッセイを用いたアゴニスト活性を測定した結果を示す。

図9はボルトナーハンター試薬を用いて作製した $[^{125}\text{I}]$ -標識MCH(4-19)のヒトSLC-1発現CH0細胞から調製した細胞膜画分に対する特異的結合を示す。

図10はボルトナーハンター試薬を用いて作製した $[^{125}\text{I}]$ -標識MCH(4-19)に

対するMCHの結合阻害活性を示す。

発明を実施するための最良の形態

本明細書において、「実質的に同一」とはポリペプチドなどの活性、例えば
5 、リガンド（MCH）と受容体（SLC-1）の結合活性、生理的な特性などが、実質的に同じことを意味する。

本発明で用いられるSLC-1またはその塩（以下、単にSLC-1と略称する場合がある）およびMCHもしくはその誘導体またはその塩（以下、単にMCHと略称する場合がある）の製造法を以下にさらに詳細に説明する。

- 10 本発明で用いられるSLC-1およびMCHとしては、ヒト、温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）および魚類などのあらゆる組織（たとえば、下垂体、脾臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など）または細胞などに由来するポリペプチドであって、SLC-1としては、配列
15 番号：5または配列番号：11、MCHとしては配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドであれば如何なるものであってもよい。例えば、本発明のSLC-1としては、配列番号：5または配列番号：11で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどの他に、配列番号：5または配列番号：11で表わされるア
20 ミノ酸配列を含有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどがあげられる。実質的に同質の活性としては、例えばリガンド結合活性、シグナル伝達活性などがあげられる。実質的に同質とは、リガンド結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性の強さなどの強弱、ポリペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。本
25 発明のMCHとしては、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどの他に、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を含有するポ

リペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどがあげられる。実質的に同質の活性としては、例えばレセプター結合活性などがあげられる。実質的に同質とは、レセプター結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、レセプター結合活性の強さなどの強弱、ポリペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。

本明細書におけるSLC-1およびMCHはペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。例えば、配列番号：2、配列番号：5または配列番号：11で表されるアミノ酸配列などを含有するポリペプチドはC末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO⁻）であるが、C末端がアミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）であってもよい。エステルのRとしては、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、フェニル、 α -ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル、もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂アルキルなどのC₇₋₁₄アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などがあげられる。

本発明で用いられるSLC-1およびMCHの塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明で用いられるSLC-1およびMCHは、公知の方法（例、FEBS Letters 398 (1996) 253-258、WO 96/18651号記載の方法）に準じた方法、即ち、ヒトや

また、反応後は通常の前製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせてタンパク質（ペプチド）を精製単離することができる。上記方法で得られるタンパク質（ペプチド）が遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

SLC-1 およびMCHのアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質（ペプチド）を切り出すと同時に各種保護基を除去し、必要に応じて高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質（ペプチド）を取得する。

上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、タンパク質（ペプチド）合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としてはDCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどがあげられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBT、HOOBTなど）とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBTエステルあるいはHOOBTエステルとしてあらかじめ保護されたアミノ

酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質（ペプチド）縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。たとえばN, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 -20°C ～ 50°C の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5ないし4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどがあげられる。カルボキシル基の保護基としては、たとえばRとして上記した C_{1-6} アルキル基、 C_{3-8} シクロアルキル基、 C_{7-14} アラルキル基の他、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル基およびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド

、トリチルヒドラジドなどがあげられる。

- セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭素から誘導される基などがあげられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリーブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえばBzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどがあげられる。

- 10 ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどがあげられる。

- 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（たとえば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBT）とのエステル〕などがあげられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドがあげられる。

- 20 保護基の除去（脱離）方法としては、たとえばPd黒あるいはPd炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元などもあげられる。上記酸処理による脱離反応は一般に-25 0℃～40℃の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、

- 1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

- 10 SLC-1 およびMCHのアミド体を得る別の方法としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような
- 15 混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質（ペプチド）を得ることができる。この粗タンパク質（ペプチド）は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質（ペプチド）のアミド体を得ることができる。
- 20 SLC-1 およびMCHのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質（ペプチド）のアミド体と同様にして所望のタンパク質（ペプチド）のエステル体を得ることができる。

- 本発明で用いられるMCHの誘導体としては、①MCHの部分ペプチド、②
- 25 MCHの構成アミノ酸が欠失したペプチド、構成アミノ酸に他のアミノ酸が付加したペプチド、構成アミノ酸が他のアミノ酸に置換されたペプチド、または

③MCH、上記①記載の部分ペプチドまたは②に記載のペプチドが標識化されたものなど、SLC-1との結合能を有するものであれば何れのものであってもよい。

MCHの部分ペプチドとして具体的には、配列番号：2で表されるアミノ酸
5 配列のN末端から第5番目ないし第19番目の部分配列を含有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩などがあげられる。より具体的には、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23または配列番号：24で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩などがあげ
10 られる。

さらに、SLC-1を用いて後述のスクリーニングを行う場合に、特に好ましくは配列番号：21で表されるアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩が好ましく用いられる。

また、MCHの構成アミノ酸が欠失したペプチド、構成アミノ酸に他のアミノ酸が付加したペプチド、構成アミノ酸が他のアミノ酸に置換されたペプチド
15 としては、配列番号：2中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは1～5個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が
20 付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは1～5個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたペプチドなどがあげられる。

該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換物としては、たとえばそのアミノ酸が属するところのクラスのうち他のアミノ酸類から選ぶことができ
25 うる。非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなど

5 タミン酸などがあげられる。

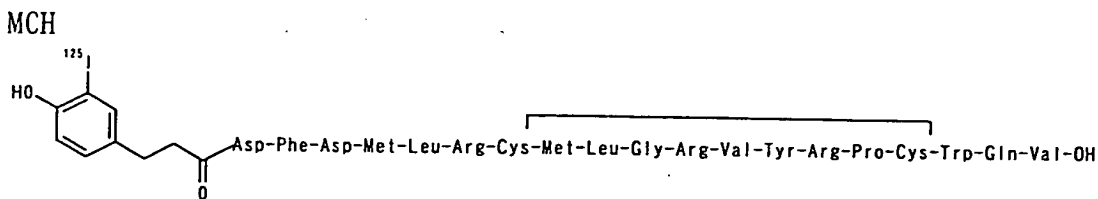
アミノ酸中、Cys 以外の位置であることが好ましい。

10 されたもの（例えば、フルオレセインなどによる蛍光標識）、ビオチン化されたもの、酵素標識されたものなどがあげられる。

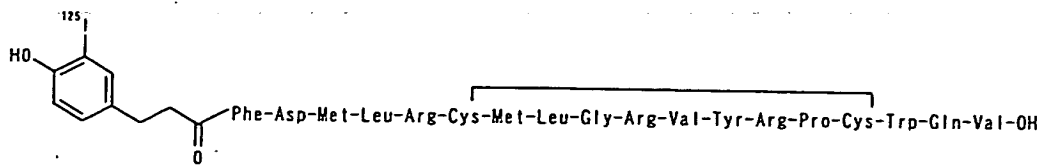
15 識体を利用することもできる。

該MCHまたはその誘導体の標識体の具体例としては、例えば、

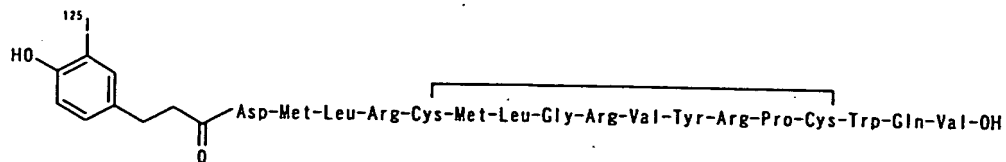
(1) [¹²⁵I] -[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-Asp¹]-



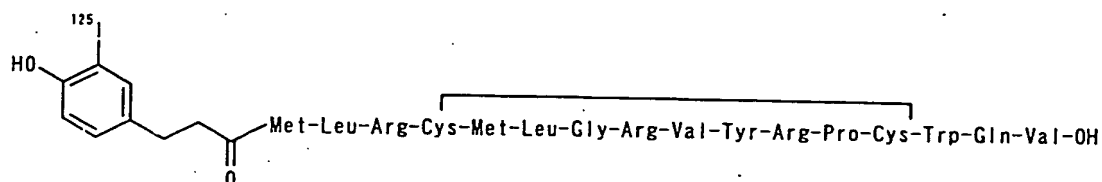
20 (2) [¹²⁵I] -[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-Phe²]-
MCH(2-19)



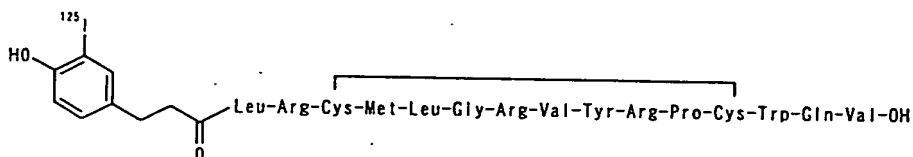
(3) [^{125}I] -[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-Asp³]-
MCH(3-19)



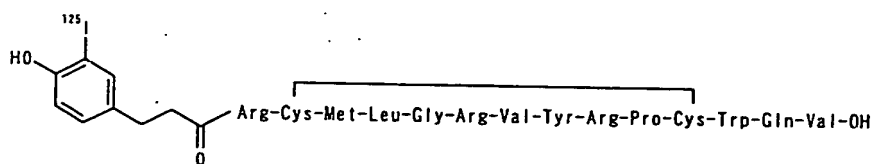
5 (4) [^{125}I] -[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-Met⁴]-
MCH(4-19)



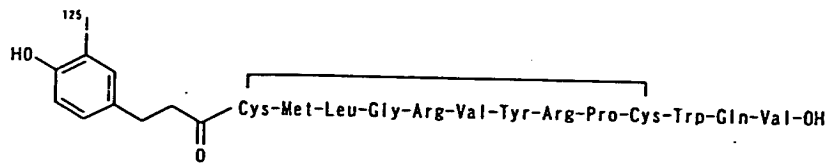
10 (5) [^{125}I] -[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-Leu⁵]-
MCH(5-19)



(6) [^{125}I] -[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-Arg⁶]-
MCH(6-19)



15 (7) [^{125}I] -[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-Cys⁷]-
MCH(7-19)



などがあげられる。

なかでも、特に $[^{125}\text{I}]$ -[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニ
5 ル)-Met⁴]-MCH(4-19)が好ましく用いられる。

MCHもしくはその誘導体の塩としては、上記のSLC-1およびMCHの
塩と同様のものなどがあげられる。

本発明で用いられるSLC-1をコードするDNAとしては、配列番号：5
または配列番号：11で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一
10 のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを
含有するDNA、本発明で用いられるMCHをコードするDNAとしては、配
列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸
配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDN
Aであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNA
15 ライブラリー、前記した組織・細胞由来のcDNA、前記した組織・細胞由来
のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用
するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドな
どいずれであってもよい。また、前記した組織・細胞よりRNA画分を調製し
たものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下
20 、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

より具体的には、(1)ストリンジェントな条件下で、配列番号：2、配列番
号：5または配列番号：11で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的
に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはペプチドをコードする塩基
配列を有するDNAを含有するDNAの有する配列とハイブリダイズするDN

A、(2)遺伝コードの縮重のため、配列番号：2、配列番号：5または配列番号：11で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAの有する配列および(1)に定められている配列とハイブリッド形成しないが、同一アミノ酸配列をもつタンパク質またはペプチドをコードするDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じた方法に従って行うことができる。上記ストリンジェントな条件としては、例えば42℃、50%ホルムアミド、4×SSPE(1×SSPE=150mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄·H₂O, 1mM EDTA pH7.4)、5×デンハート溶液、0.1% SDSである。

本発明で用いられるSLC-1またはMCHをコードするDNAは以下の遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

本発明のSLC-1またはMCHを完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のSLC-1またはMCHの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて自体公知のPCR法によって前記DNAライブラリー等から目的とするDNAを増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを例えばSLC-1またはMCHをコードする塩基配列の一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えばMolecular Cloning (2nd ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行う。

クローン化された本発明で用いられるSLC-1またはMCHをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻

訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの訳開始コドンや訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

- 5 本発明で用いられるSLC-1またはMCHの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明で用いられるSLC-1またはMCHをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

- ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR3
10 25, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモ
15 ーターであればいかなるものでもよい。

- 形質転換する際の宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどが利用できる。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、Trpプロモ
20 ーター、T7プロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADH1プロモーター、GALプロモーターなどが好
25 ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシング
 シグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、
 SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いるこ
 とができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、
 5 dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、
 アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマ
 イシン耐性遺伝子（以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性）等が
 あげられる。特に、CHO（dhfr⁻）細胞を用いてDHFR遺伝子を選択
 マーカーとして使用する場合、チミジンを含まない培地によっても選択できる
 10 。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、ポリペプチドまたはそ
 の部分ペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は
 、phoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌で
 ある場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列な
 15 どが、宿主が酵母である場合は、メイティングファクター α （MF α ）・シグナ
 ル配列、インベルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には
 、例えばインシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列
 、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築されたSLC-1またはMCHをコードするDNAを含
 20 有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫また
 は昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K1
 2・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・
 25 サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）
 、60巻、160（1968）〕、JM103〔ヌクレック・アシックス・リサ

- ーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221
 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology
)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレ
 キュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネテ
 5 イックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*)
 MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナ
 ル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(
 1984)] などが用いられる。

- 10 酵母としては、たとえばサッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces
 cerevisiae*) AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20
 B-12などが用いられる。

昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー
 (Nature), 315巻, 592(1985)]。

- 15 昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫
 由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の
 中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra*
*brassicae*由来の細胞または*Estigmene acrea*由来の細胞などが用いられる。ウ
 イルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞)
 20 などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711
)、Sf21細胞 [以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィトロ (in Vitro), 1
 3巻, 213-217頁 (1977年)] などが用いられる。

- 動物細胞としては、たとえばサルCOS-7細胞、Vero細胞、チャイニーズ
 ハムスター細胞CHO, DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CH
 25 O (dhfr⁻CHO細胞)、マウスL細胞、マウス3T3細胞、マウスミエロ
 ーマ細胞、ヒトHEK293細胞、ヒトFL細胞、293細胞、C127細胞

、BALB 3 T 3細胞、S p - 2 / O細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 69巻, 2110 (1972) やジーン (Gene) , 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なわれる。

バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行われる。

酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 75巻, 1929 (1978) に記載の方法に従って行なわれる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、たとえばバイオ／テクノロジー (Bio/Technology) , 6巻, 47-55頁 (1988年) などに記載の方法に従って行なわれる。

動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なわれる。

発現ベクターの細胞への導入方法としては、例えば、リポフェクション法 [Felgner, P.L. et al. プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America) , 84巻, 7413頁 (1987年)]、リン酸カルシウム法 [Graham, F. L. and van der Eb, A. J. ヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456-467頁 (1973年)]、電気穿孔法 [Niemann, E. et al. エンボ・ジャーナル (EMBO J.) , 1巻, 841-845頁 (1982年)] 等があげられる。

このようにして、本発明で用いられるSLC-1またはMCHをコードする

DNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。

なお、動物細胞を用いて、本発明で用いられるSLC-1またはMCHを安定に発現させる方法としては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた細胞をクローン選択によって選択する方法がある。具体的には、上記の選択マーカーを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカーを用いて得られた動物細胞に対して、繰り返しクローン選択を行なうことにより本発明で用いられるSLC-1またはMCHの高発現能を有する安定な動物細胞株を得ることができる。また、dhfr遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、dhfr遺伝子とともに、本発明で用いられるSLC-1またはMCHをコードするDNAを細胞内で増幅させて、さらに高発現の動物細胞株を得ることもできる。

上記の形質転換体を本発明で用いられるSLC-1またはMCHをコードするDNAが発現可能な条件下で培養し、本発明で用いられるSLC-1またはMCHを生成、蓄積せしめることによって、本発明で用いられるSLC-1またはMCHを製造することができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミ

ノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 77巻, 4505(1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 81巻, 5330(1984)〕があげられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature) , 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約

5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)〕, DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)〕, RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of The American Medical Association) 199巻, 519(1967)〕, 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of The Society for The Biological Medicine), 73巻, 1(1950)〕などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 10 特にCHO (dhfr⁻) 細胞およびdhfr遺伝子を選択マーカーとして用いる場合には、チミジンをほとんど含まない透析ウシ胎児血清を含むDMEM培地を用いるのが好ましい。

上記培養物から本発明で用いられるSLC-1またはMCHを分離精製するには、例えば下記の方法により行なうことができる。

- 15 本発明で用いられるSLC-1またはMCHを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により本発明で用いられるSLC-1またはMCHの粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液
20 の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク変性剤や、トリトンX-100（登録商標。以下、TMと省略することがある。）などの界面活性剤が含まれていてもよい。

- 培養液中に本発明で用いられるSLC-1またはMCHが分泌される場合には、培養終了後、自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清
25 を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明で用

いられるSLC-1またはMCHの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法やクロマトフォーカシングなどの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

- 5 かくして得られる本発明で用いられるSLC-1またはMCHが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

- 15 なお、組換え体が産生する本発明で用いられるSLC-1またはMCHを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、タンパク質（ペプチド）を部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。またN末端アミノ酸を欠失させるためには、エドマン(Edman)試薬（フェニルイソチオシアネート）を用いた公知のエドマン法を用いることが可能である。

20 かくして生成する本発明で用いられるSLC-1またはMCHの存在は特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

- 25 (2) MCHもしくはその誘導体またはその塩およびSLC-1またはその塩を用いることを特徴とするMCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法またはMCHもしくはその標識体またはその塩およびSLC-1またはその塩を用いることを

特徴とするMCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット（以下、本発明のスクリーニング方法、本発明のスクリーニング用キットと略記する）について以下に詳述する。

- 5 SLC-1またはその塩を用いるか、または組換え型SLC-1の発現系を構築し、該発現系を用いたMCHもしくはその誘導体またはその塩との結合アッセイ系（リガンド・レセプターアッセイ系）を用いることによって、MCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合性を变化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）

- 10 またはその塩をスクリーニングすることができる。

このような化合物には、SLC-1を介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（即ちSLC-1アゴニスト）と該細胞刺激活性を有しない化合物（即ちSLC-1アンタゴニスト）などが含まれる。「MCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合性を变化させる」とは、MCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合を阻害する場合とリガンドとの結合を促進する場合の両方を包含するものである。

- 20 すなわち、本発明は、（i）SLC-1またはその塩に、MCHもしくはその誘導体またはその塩を接触させた場合と（ii）上記したSLC-1またはその塩に、MCHもしくはその誘導体またはその塩および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするMCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法
- 25 を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、（i）上記したSLC-1または

その塩に、MCHもしくはその誘導体またはその塩を接触させた場合と (ii) 上記したSLC-1またはその塩に、MCHもしくはその誘導体またはその塩および試験化合物を接触させた場合における、例えば該SLC-1またはその塩に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較する。

5 本発明のスクリーニング方法は具体的には、

①標識したMCHもしくはその誘導体またはその塩（「MCHの誘導体またはその塩」として、上記の「MCH等が標識化されたものまたはその塩」を用いる場合には、更に標識する必要はない。以下同じ。）を、上記したSLC-1またはその塩に接触させた場合と、標識したMCHもしくはその誘導体またはその塩および試験化合物をSLC-1またはその塩に接触させた場合における、標識したMCHもしくはその誘導体またはその塩の該SLC-1またはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするMCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

15 ②標識したMCHもしくはその誘導体またはその塩を、SLC-1を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したMCHもしくはその誘導体またはその塩および試験化合物をSLC-1を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したMCHもしくはその誘導体またはその塩の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするMCHまたはその塩とSLC-1との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

20 ③標識したMCHもしくはその誘導体またはその塩を、SLC-1をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したSLC-1に接触させた場合と、標識したMCHもしくはその誘導体またはその塩および試験化合物をSLC-1をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したSLC-1に接触させた場合におけ

る、標識したMCHもしくはその誘導体またはその塩のSLC-1に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするMCHまたはその塩とSLC-1との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- ④SLC-1を活性化する化合物（例えば、MCHもしくはその誘導体またはその塩）をSLC-1を含有する細胞に接触させた場合と、SLC-1を活性化する化合物および試験化合物をSLC-1を含有する細胞に接触させた場合における、SLC-1を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするMCHまたはその塩とSLC-1との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

- ⑤SLC-1を活性化する化合物（例えば、MCHもしくはその誘導体またはその塩など）をSLC-1をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したSLC-1に接触させた場合と、SLC-1を活性化する化合物および試験化合物を、SLC-1をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したSLC-1に接触させた場合における、SLC-1を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするMCHまたはその塩とSLC-1との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法などである。

- 25 本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いるSLC-1としては、上記のS

LC-1を含有するものであれば何れのものであってもよいが、ヒト、温血動物、魚類などの臓器の膜画分などが好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたSLC-1などが適している。特にヒト型S

- 5 LC-1については、既報 (FEBS Letters 398 (1996) 253-258など) のアミノ酸配列で表されるSLC-1に比べ、配列番号: 11で表されるアミノ酸配列を含有するSLC-1を用いることにより、感度のよいスクリーニングが可能となる。

SLC-1を製造するには、前述の方法などが用いられる。

- 10 本発明のスクリーニング方法において、SLC-1を含有する細胞あるいは該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

SLC-1を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

- 15 SLC-1を含有する細胞としては、SLC-1を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などがあげられる。

膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem

- 20 型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm ~
- 25 3000 rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm ~ 30000 rpm) で通常30分~2時間遠心し、得

られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したSLC-1と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該SLC-1を含有する細胞や膜画分中のSLC-1の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

MCHまたはその塩とSLC-1との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、適当なSLC-1画分と、標識したリガンドまたはリガンド活性を有する化合物（MCHもしくはその誘導体）が用いられる。SLC-1画分としては、天然型のSLC-1画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型SLC-1画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドまたはリガンド活性を有する化合物としては、標識したリガンドまたはリガンド活性を有する化合物（MCHまたはその誘導体）などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたりガンド（MCHまたはその誘導体）などを利用することができる。特に、ボルトン-ハンター試薬を用いて公知の方法で調製したMCHの誘導体の標識体を利用することもできる。

MCH誘導体の標識体の具体例としては、例えば、上記の（１）～（７）で表される化合物などがあげられる。

具体的には、MCHまたはその塩とSLC-1との結合性を变化させる化合物のスクリーニングを行うには、まずSLC-1を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターと

の結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるSLC-1やMCHもしくはその誘導体の分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01 ml ~ 1.0 ml の該レセプター溶液に、一定量（5000 cpm ~ 50000 cpm）の標識したMCHもしくはその誘導体を添加し、同時に 10^{-4} ~ 10^{-1} μ Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のMCHもしくはその誘導体を加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたは γ -カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ B_0 ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0 - \text{NSB}$ ）を100%とした時、特異的結合量（ $B - \text{NSB}$ ）が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

また、SLC-1とMCHもしくはその誘導体との結合を測定する方法として、BIAcore（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いることもできる。この方法では、MCHもしくはその誘導体を装置に添付のプロトコルに従ったアミノカップリング法によってセンサーチップに固定し、SLC-1を含有する細胞またはSLC-1をコードするDNAを含有する形質変換体から精製したSLC-1またはSLC-1を含む膜画分、あるいは精製したSLC-1またはSLC-1を含む膜画分および試験化合物を含むリン酸バッファーまたはトリスバッファーなどの緩衝液をセンサーチップ上を毎分2-20

μ lの流量で通過させる。センサーチップ上のMCHもしくはその誘導体とSLC-1とが結合することによって生じる表面プラズモン共鳴の変化を共存する試験化合物が変化させることを観察することによってSLC-1とMCHとの結合を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができる。この方法

5 は、SLC-1をセンサーチップに固定し、MCHもしくはその誘導体またはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を含むリン酸バッファーまたはトリスバッファーなどの緩衝液をセンサーチップ上を通過させる方法を用いても同様に測定することができる。試験化合物としては、上記と同様のものなどがあげられる。

- 10 MCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の④～⑤の方法を実施するためには、SLC-1を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、
- 15 pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、SLC-1を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした
- 20 後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大さ
- 25 せておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なSLC-1を

発現した細胞が必要である。本発明のSLC-1を発現した細胞としては、前述の組換え型SLC-1発現細胞株などが望ましい。形質転換体であるSLC-1発現細胞は安定発現株でも一過性発現株でも構わない。また、動物細胞の種類は上記と同様のものが用いられる。

- 5 試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

上記のリガンド・レセプターアッセイ系について、さらに具体的に記載すると以下のようなアッセイ系が用いられる。

- 10 (1) 受容体発現細胞が受容体アゴニストによって刺激されると細胞内のGタンパクが活性化されてGTPが結合する。この現象は受容体発現細胞の膜画分においても観察される。通常、GTPは加水分解されてGDPへと変化するが、このとき反応液中にGTP γ Sを添加しておくるとGTP γ SはGTPと同様にGタンパクに結合するが、加水分解されずにGタンパクを含む細胞膜に結合した状態が維持される。標識したGTP γ Sを用いると細胞膜に残存した放射活性を測定することによって受容体アゴニストの受容体発現細胞刺激活性を測定することができる。この反応を利用してMCHもしくはその誘導体のSLC-1発現細胞に対する刺激活性を測定することができる。この方法は、前記④～⑤のようにSLC-1を含む細胞を用いるものではなく、①～③のようにSLC-1を含む膜画分を用いるアッセイ法であるが、④～⑤のように細胞刺激活性を測定するものであり、本測定法においてSLC-1膜画分へのGTP γ S結合促進活性を示す物質はアゴニストである。具体的には、後述の実施例9、実施例16およびそれらに準じた方法により行われる。ここにおいて、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を
- 20 添加し、MCHもしくはその誘導体の単独投与に比べてSLC-1細胞膜画分へのGTP γ S結合促進活性に変化が生じることを観察することによってMC
- 25

HとSLC-1との結合性を变化させる化合物をスクリーニングすることができる。このとき、MCHもしくはその誘導体によるSLC-1細胞膜画分へのGTP γ S結合促進活性を抑制する活性を示す化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、SLC-1細胞膜画分へのGTP γ S結合促進活性を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一例についてより具体的に以下に述べる。後述の実施例9または実施例16に述べた方法によって調製したヒトまたはラットSLC-1を含む細胞膜画分を、膜希釈緩衝液(50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1 μ M GDP, 0.1% BSA pH 7.4)で希釈する。希釈率は、受容体の発現量により異なる。これをFalcon2053に0.2mlずつ分注し、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を加え、さらに終濃度200 pMとなるように[³⁵S]GTP γ Sを加える。25℃で1時間保温した後、氷冷した洗浄用緩衝液(50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0.1% BSA, 0.05% CHAPS pH 7.4 1.5ml)を加えて、ガラス繊維ろ紙GF/Fでろ過する。65℃、30分保温して乾燥後、液体シンチレーションカウンターでろ紙上に残った膜画分に結合した[³⁵S]GTP γ Sの放射活性を測定する。MCHもしくはその誘導体のみを加えた実験区の放射活性を100%、MCHもしくはその誘導体を加えなかった実験区の放射活性を0%とし、MCHもしくはその誘導体によるGTP γ S結合促進活性に対する試験化合物の影響を算出する。GTP γ S結合促進活性が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

(2) SLC-1発現細胞はMCH刺激によって細胞内cAMP量が減少する。この反応を利用してMCHのSLC-1発現細胞に対する刺激活性を測定することができる。

SLC-1を発現させた種々の動物細胞のcAMP産生量はマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウシなどを免疫して得られた抗cAMP抗体と¹²⁵I標識cAMP(ともに市

販品)を使用することによってRIAあるいは抗cAMP抗体と標識cAMPとを組み合わせた他のEIA系でも測定することができる。また抗cAMP抗体をprotein Aあるいは抗cAMP抗体産生に用いた動物のIgGなどに対する抗体などを使用して固定したシンチラントを含むビーズと¹²⁵I標識cAMPとを使用するSPA法による定量も可能である(アマシャムファルマシアバイオテック製のキットを使用する)。

cAMP産生抑制のアッセイは、具体的には後述の実施例14およびそれに準じた方法により行われる。この系において、フォルスコリンまたはcalcitoninなど細胞内cAMP量を増加させるようなリガンドなどによって細胞内cAMP量を上昇させ、MCHもしくはその誘導体またはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を添加することによってMCHもしくはその誘導体の単独投与による細胞内cAMP量の抑制が変化することを観察し、MCHとSLC-1の結合を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができる。このとき、MCHもしくはその誘導体によるSLC-1発現細胞のcAMP産生抑制活性を阻害する活性を示す化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを添加してcAMP産生抑制活性を調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうことができる。

スクリーニング法をより具体的に以下に記載する。CHO/SLC-1細胞を24穴プレートに 5×10^4 cell/wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.2mM 3-イソブチルメチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)で洗浄する(以下、0.2mM 3-イソブチルメチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)を、反応用バッファーと呼ぶ)。その後0.5mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温する。反応用バッファーを除き、新たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、2μMフォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファーに1nMのMCHもしくはその誘導体あるいは1nMのMCHもしくはその誘導体および試験化合物を添加したものを細胞に加え、37℃で24分間反応させる。100μlの20%過塩素酸を加

- えて反応を停止させ、次に氷上で1時間置くことにより細胞内cAMPを抽出する。抽出液中のcAMP量は、cAMP EIAキット（アマシャムファルマシアバイオテック）を用いて測定する。フォルスコリン刺激によって産生されたcAMP量を100%とし、1 nMのMCHもしくはその誘導体の添加によって抑制されたcAMP量を0%として、MCHもしくはその誘導体によるcAMP産生抑制活性に対する試験化合物の影響を算出する。MCHもしくはその誘導体の活性を阻害してcAMP産生活性が例えば50%以上になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

- cAMP産生促進活性を測定するには、フォルスコリンを添加せずにCHO/SLC-1細胞に試験化合物を添加して産生されたcAMPを上記の方法で定量する。

- (3) CRE (cAMP response element) を含むDNAを、ピッカジーン ベイシックベクターまたはピッカジーン エンハンサーベクター（東洋インキ製造（株））のルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクロニングサイトに挿入し、これをCRE-レポーター遺伝子ベクターとする。CRE-レポーター遺伝子ベクターをトランスフェクションした細胞において、cAMP上昇を伴う刺激は、CREを介したルシフェラーゼ遺伝子発現とそれに引き続くルシフェラーゼタンパク質の産生を誘導する。つまり、ルシフェラーゼ活性を測定することにより、CRE-レポーター遺伝子ベクター導入細胞内のcAMP量の変動を検出することができる。CRE-レポーター遺伝子ベクターをSLC-1発現細胞にトランスフェクションした細胞を利用してMCHとSLC-1の結合を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができる。具体的なスクリーニング法を以下に記す。

- CRE-レポーター遺伝子導入SLC-1発現細胞を24穴プレートに 5×10^3 cell/wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.2mM 3-イソブチル-メチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)で洗浄する（以下、0.2mM 3-イソブチル-メチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)を、反応用バッファーと呼ぶ）。その

後0.5mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温する。反応用バッファーを除き、新たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、1 nMのMCHもしくはその誘導体あるいは1 nMのMCHもしくはその誘導体および試験化合物と2 μ Mフォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファーを細胞に加え、37℃で24分間反応させる。細胞をピッカジーン用細胞溶解剤（東洋インキ製造（株））で溶かし、溶解液に発光基質（東洋インキ製造（株））を添加する。ルシフェラーゼによる発光は、ルミノメーター、液体シンチレーションカウンターまたはトップカウンターにより測定する。MCHとSLC-1の結合を変化させる化合物の影響はルシフェラーゼによる発光量をMCHもしくはその誘導体を単独で投与した場合と比較することによって測定することができる。このとき、MCHもしくはその誘導体の投与によりフォルスコリン刺激による発光量の増加が抑制されるが、この抑制を回復させる化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、フォルスコリン刺激によって上昇した発光量のMCHもしくはその誘導体と同様な抑制を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼ以外に例えばアルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼあるいは β -ガラクトシダーゼを用いることもできる。これらのレポーター遺伝子の遺伝子産物の酵素活性は以下のように市販の測定キットを用いて容易に測定することができる。アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製Lumi-Phos 530によって、クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼ（chloramphenicol acetyltransferase）活性は、例えば和光純薬製FAST CAT chloramphenicol Acetyltransferase Assay Kitによって、 β -ガラクトシダーゼ活性は、例えば和光純薬製Aurora Gal-XEによって測定することができる。

（4）SLC-1発現細胞はMCH刺激の結果アラキドン酸代謝物を細胞外に

放出する。あらかじめ、放射活性を有するアラキドン酸を細胞に取り込ませておくことによって、この活性を細胞外に放出された放射活性を測定することによって測定することができる。測定は、後述の実施例 6 およびそれに準じた方法により行われる。このとき、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもし

- 5 くはその誘導体および試験化合物を添加して、MCHもしくはその誘導体のアラキドン酸代謝物放出活性に対する影響を調べることにより、MCHとSLC-1の結合に影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。このとき、MCHもしくはその誘導体によるアラキドン酸代謝物放出活性を阻害する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。また、試験化合物のみを添加し、SLC-1発現細胞のアラキドン酸代謝物放出活
- 10 性を後述の実施例 6 に準じた方法で調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうこともできる。MCHとSLC-1の結合に影響を与える化合物のスクリーニング法より具体的に以下に述べる。

- CHO/SLC-1細胞を24穴プレートに 5×10^4 cell/wellで播種し、24時間培養後、
- 15 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸を $0.25 \mu\text{Ci/well}$ となるよう添加する。 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸添加16時間後、細胞を0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンスバッファー(pH7.4)で洗浄し、各wellに0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンスバッファー(pH7.4)に溶解した終濃度10 nMのMCHもしくはその誘導体あるいは10 nMのMCHもし
- 20 くはその誘導体および試験化合物を含むバッファー500 μl を添加する。以降、0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンスバッファー(pH7.4)を反応用バッファーと呼ぶ。37℃で60分間インキュベートした後に、反応液400 μl をシンチレーターに加え、反応液中に遊離した $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量をシンチレーションカウンターにより測定する。MCHもしくはその誘導体の非添加反応バッファ
- 25 ーによる培地中の $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量を0%とし、10 nMのMCHもしくはその誘導体を添加したときの培地中の $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量を100%として試験化合物のMCHもしくはその誘導体とSLC-1の結合に対する影響

を算出する。アラキドン酸代謝物産生活性が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

- (5) SLC-1 発現細胞をMCHによって刺激することによって細胞内のCa濃度が上昇する。これを利用することによってMCHとSLC-1の結合に対する試験化合物の影響を調べることができる。

- SLC-1 発現細胞を、滅菌した顕微鏡用カバーガラス上に播き、2日後、培養液を4 mM Fura-2 AM (同仁化学研究所) を懸濁したHBSSに置換し、室温で2時間30分おく。HBSSで洗浄した後、キュベットにカバーガラスをセットし、蛍光測定器で、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を加えたときの励起波長340nm及び380nmでの505nmの蛍光強度の比の上昇を測定する。このとき、MCHもしくはその誘導体を単独で投与したときに比べて試験化合物の添加によって生じる蛍光強度の変化を測定することによりMCHとSLC-1の結合に対して影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。また、以下のようにFLIPR (モレキュラーデバイス社製) を使うこともできる。すなわち、細胞懸濁液にFluo-3 AM (同仁化学研究所製) を添加し、細胞に取り込ませた後、上清を遠心により数度洗浄後、96穴プレートに細胞を播く。FLIPR装置にセットし、Fura-2の場合と同様にMCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を加え、MCHもしくはその誘導体を単独で投与したときに比べて試験化合物の添加によって観測される蛍光強度が変化することを測定することにより、MCHもしくはその誘導体とSLC-1の結合に対して影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。これらにおいて、MCHもしくはその誘導体による蛍光強度の上昇を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみの添加による蛍光強度の上昇を観察することによってアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

SLC-1 発現細胞にaequorinなどのように細胞内Caイオンの上昇によって

発光するようなタンパク質の遺伝子を共発現させておき、細胞内Caイオン濃度の上昇によってaequorinがCa結合型となり発光することを利用して、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を加え、MCHもしくはその誘導体を単独で投与したときに比べて試験化合物の添加によって観測される発光強度が変化することを測定することにより、MCHとSLC-1の結合に対して影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。方法は、蛍光物質を取り込ませないこと以外は上記と同様である。

(6) 受容体を発現する細胞に受容体アゴニストを添加すると、細胞内イノシトール三リン酸濃度が上昇することが知られている。MCHによって生じるSLC-1細胞におけるこの反応を観察することによりMCHとSLC-1の結合に影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。24穴プレートに播いて1日目の細胞にmyo-[2-³H]inositol (2.5マイクロCi/well)を添加した培地中で1日培養した細胞を、よく洗浄後、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を添加した後、10%過塩素酸を加え反応を止める。1.5 M KOH, 60mM HEPES溶液で中和し、0.5ml のAG1x8樹脂 (Bio-Rad)を詰めたカラムに通し、5mM Na₂B₄O₇ 60mM HCOONH₄で洗浄した後、1 M HCOONH₄ 0.1 M HCOOHで溶出した放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定する。MCHもしくはその誘導体の非添加反応バッファーによる培地中の放射活性を0%とし、MCHもしくはその誘導体を添加したときのたときの培地中の放射活性を100%として試験化合物のMCHもしくはその誘導体とSLC-1の結合に対する影響を算出する。イノシトール三リン酸産生活性が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみの添加によるイノシトール三リン酸産生上昇を観察することによってアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

(7) TRE (TPA response element) を含むDNAを、ピッカジーン ベイシッ

クベクターまたはピッカジーン エンハンサーベクター（東洋インキ製造（株））のルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクローニングサイトに挿入し、これをTRE-レポーター遺伝子ベクターとする。TRE-レポーター遺伝子ベクターをトランスフェクションした細胞において、細胞内Ca上昇を伴う刺激は、TREを介したルシフェラーゼ遺伝子発現とそれに引き続くルシフェラーゼタンパク質の産生を誘導する。つまり、ルシフェラーゼ活性を測定することにより、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入細胞内のカルシウム量の変動を検出することができる。TRE-レポーター遺伝子ベクターをSLC-1発現細胞にトランスフェクションした細胞を利用したMCHとSLC-1の結合を変化させる化合物の具体的なスクリーニング法を以下に記す。

TRE-レポーター遺伝子導入SLC-1発現細胞を24穴プレートに 5×10^3 cell/wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンスバッファー(pH7.4)で洗浄した後、10 nMのMCHもしくはその誘導体あるいは10 nMのMCHもしくはその誘導体および試験化合物を添加し、37℃で60分間反応させる。細胞をピッカジーン用細胞溶解剤（東洋インキ製造（株））で溶かし、溶解液に発光基質（東洋インキ製造（株））を添加する。ルシフェラーゼによる発光は、ルミノメーター、液体シンチレーションカウンターまたはトップカウンターにより測定する。MCHもしくはその誘導体とSLC-1の結合を変化させる化合物の影響は、ルシフェラーゼによる発光量をMCHもしくはその誘導体を単独で投与した場合と比較することによって測定することができる。このとき、MCHもしくはその誘導体の投与により細胞内Caの上昇によって発光量が増加するが、この増加を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、MCHもしくはその誘導体と同様な発光量の増加を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼ以外に例えばアルカリフォスファ

ターゼ、クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼあるいは β -ガラクトシダーゼを用いることもできる。これらのレポーター遺伝子の遺伝子産物の酵素活性は以下のように市販の測定キットを用いて容易に測定することができる。アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製Lumi-Phos 530によって、クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyltransferase) 活性は、例えば和光純薬製FAST CAT chrolamphenicol Acetyltransferase Assay Kitによって、 β -ガラクトシダーゼ活性は、例えば和光純薬製Aurora Gal-XEによって測定することができる。

(8) MCHに応答したSLC-1発現細胞はMAP kinase活性化によって増殖が観察される。この増殖をMAP kinase活性、チミジン取り込み、細胞数測定 (MTTなど) によって測定することができる。これを利用してMCHもしくはその誘導体とSLC-1の結合を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができる。

MAP kinase活性は、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を細胞に添加した後、細胞溶解液から抗MAP kinase抗体を用いた免疫沈降によってMAP kinase分画を得た後、例えば和光純薬製MAP Kinase Assay Kitと γ -[32 P]-ATPを使用して容易に測定できる。チミジン取り込み活性は、SLC-1発現細胞を播き、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を添加した後、[methyl- 3 H]-チミジンを加え、その後、細胞内に取り込まれた標識チミジンの放射活性を細胞を溶解して液体シンチレーションカウンターで計数することによって測定することができる。

SLC-1発現細胞の増殖は、発現細胞を播き、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を添加した後にMTT (3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) を添加し、細胞内に取り込まれてMTTが変化したMTTホルマザンを塩酸酸性としたイソ

プロパノールで細胞を溶解した後、570 nmの吸収を測定することによっても測定できる。

MCHとSLC-1の結合を変化させる化合物の、標識チミジン取り込み活性を利用した具体的なスクリーニング法を以下に記す。

- 5 SLC-1発現細胞を24穴プレートにウェル当たり5000個まき一日間培養する。次に血清を含まない培地で2日間培養し、細胞を飢餓状態にする。MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を細胞に添加して24時間培養した後、[methyl-³H]-チミジンをウェル当たり0.015 MBq添加し6時間培養する。細胞をPBSで洗った後、メタノールを添加して10分間放置する。次に5%トリクロロ酢酸を添加して15分間
- 10 放置後、固定された細胞を蒸留水で4回洗う。0.3 N水酸化ナトリウム溶液で細胞を溶解し、溶解液中の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定する。MCHとSLC-1の結合を変化させる化合物の影響は、チミジン取り込みによる放射活性の上昇をMCHもしくはその誘導体を単独で投与した場合と比較することによって測定することができる。このとき、MCHもしくはその誘導体の投与による放射活性の増加を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、MCHもしくはその誘導体と同様な放射活性の増加を観察することによりアゴニ
- 15 ストのスクリーニングを行なうこともできる。
- 20 (9) SLC-1発現細胞にMCHを添加すると、K channelが活性化し、細胞内にあるKイオンが、細胞外に流出する。Kイオンと同族元素であるRbイオンは、Kイオンと区別無くK channelを通して細胞外に流出するので、細胞に標識Rb ([⁸⁶Rb])を添加して取り込ませておいた後、MCHの刺激によって流出する [⁸⁶Rb]の流れを測定することでMCHの作用を測定できる。MCHとSLC-1
- 25 の結合を変化させる化合物の、 [⁸⁶Rb]流出活性を利用した具体的なスクリーニング法を以下に記す。

24穴にまいて2日後のSLC-1発現細胞を1mCi/mlの $^{86}\text{RbCl}$ を含む培地中で2時間保温する。培地をよく洗浄し、外液中の $^{86}\text{RbCl}$ を完全に除く。MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を細胞に添加して30分後の外液を回収し、 γ カウンターで放射活性を測定する

- 5 MCHもしくはその誘導体とSLC-1の結合を変化させる化合物の影響は、 ^{86}Rb 流出による放射活性の上昇をMCHもしくはその誘導体を単独で投与した場合と比較することによって測定することができる。このとき、MCHもしくはその誘導体の投与による放射活性の上昇を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し
- 10 MCHもしくはその誘導体と同様な放射活性の上昇を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

- (1.0) SLC-1発現細胞がMCHに反応して変化する細胞外のpH (acidification rate) をCytosensor装置 (モレキュラーデバイス社) を使用して測定することによって、MCHの活性を測定することができる。C
- 15 ytosensor装置を利用した、細胞外pH変化の測定をすることによるMCHとSLC-1の結合を変化させる化合物の具体的なスクリーニング法を以下に記す。

- SLC-1発現細胞をCytosensor装置用のカプセル内で終夜培養し、装置のチャンバーにセットして細胞外pHが安定するまで約2時間0.1% BSA
- 20 を含むRPMI1640培地 (モレキュラーデバイス社製) を灌流させる。pHが安定した後、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を含む培地を細胞上に灌流させることによって生じる培地のpH変化を測定する。MCHとSLC-1の結合を変化させる化合物の影響は、SLC-1発現細胞の細胞外pH変化をMCHもしくはその誘導体を単独で投与した
- 25 場合と比較することによって測定することができる。このとき、MCHもしくはその誘導体の投与による細胞外pH変化を抑制する化合物を拮抗阻害能力の

ある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、MCHもしくはその誘導体と同様な細胞外pH変化を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

- (11) 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のhaploid α -mating Type (MAT α) の性フェロモン受容体Ste2はG蛋白Gpa1とカップルしており、性フェロモン α -mating factorに応答してMAP kinaseを活性化し、以下、Far1 (cell-cycle arrest) および転写活性化因子Ste12が活性化される。Ste12は接合に関与するFUS1を含む種々の蛋白の発現を誘導する。一方、制御因子Sst2は以上の過程に抑制的に機能する。この系において、受容体遺伝子を導入した酵母を作製し、
 5 受容体アゴニスト刺激によって酵母細胞内のシグナル伝達系を活性化し、その結果生じる増殖などの指標を用いた、受容体アゴニストと受容体との反応の測定系の試みが行なわれている (Pausch, M. H., Trends in Biotechnology, vol. 15, pp. 487-494 (1997))。このような受容体遺伝子導入酵母の系を利用してMCHおよびSLC-1の結合を変化させる化合物のスクリーニングを行なう
 10 ことができる。

- MAT α 酵母のSte2およびGpa1をコードする遺伝子を除去し、代わりにSLC-1遺伝子およびGpa1-Gai2融合蛋白をコードする遺伝子を導入する。Farをコードする遺伝子を除去してcell-cycle arrestが生じないようにし、また、Sst1をコードする遺伝子を除去することによってMCHに対する応答の感度を向上させておく。さらに、FUS1にヒスチジン生合成遺伝子HIS3をつなげたFUS1-HIS3遺伝子を導入する。以上の遺伝子組換え操作は例えば、Priceら (Price, L. A. et al., Molecular and Cellular Biology, vol. 15, pp. 6188-6195 (1995)) の報告に記載の方法において、ソマトスタチン受容体タイプ2 (SSTR2) 遺伝子をSLC-1に置き換えて実施することによって容易に行なうことができる。こ
 20 うして構築された形質変換酵母はSLC-1のリガンドであるMCHに高感度で反応し、その結果MAPキナーゼの活性化が起きてヒスチジン生合成酵素が合成

されるようになって、ヒスチジン欠乏培地で生育可能になる。これを利用して、ヒスチジン欠乏培地での酵母の生育を指標としてMCHによるSLC-1発現酵母の応答を観察することができる。以下にMCHおよびSLC-1の結合を変化させる化合物のスクリーニング法を述べる。

- 5 上記のようにして作製された形質変換酵母を完全合成培地の液体培地で終夜培養し、 2×10^4 cell/mlの濃度でヒスチジンを除去した溶解寒天培地に加え、 9×9 cmの角形シャーレに播く。寒天が固化した後、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物をしみこませた滅菌濾紙を寒天表面におき、30℃で3日間培養する。MCHもしくはその誘導体とSLC-1の結合を変化させる化合物の影響は、濾紙の周囲の酵母の生育をMCHもしくはその誘導体を単独で投与した場合と比較することによって測定することができる。このとき、MCHもしくはその誘導体の投与による酵母の生育を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、MCHもしくはその誘導体と同様な酵母の生育を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。
- 10 また、あらかじめ、寒天培地にMCHもしくはその誘導体を添加しておいて滅菌濾紙に試験化合物のみをしみこませて培養し、シャーレ全面での酵母の生育が濾紙の周囲で影響を受けることを観察することによってもMCHとSLC-1の結合を変化させる化合物の影響を調べることができる。
- 15 (12) SLC-1遺伝子RNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、MCHによって刺激すると細胞内Caイオン濃度が上昇して、calcium-activated chloride currentが生じる。これを膜電位の変化としてとらえることが出来る(Kイオン濃度勾配に変化がある場合も同様)。MCHによって生じるSLC-1導入アフリカツメガエル卵母細胞におけるこの反応を観察することによりMCHとSLC-1の結合に影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。
- 20 (12) SLC-1遺伝子RNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、MCHによって刺激すると細胞内Caイオン濃度が上昇して、calcium-activated chloride currentが生じる。これを膜電位の変化としてとらえることが出来る(Kイオン濃度勾配に変化がある場合も同様)。MCHによって生じるSLC-1導入アフリカツメガエル卵母細胞におけるこの反応を観察することによりMCHとSLC-1の結合に影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。
- 25 (12) SLC-1遺伝子RNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、MCHによって刺激すると細胞内Caイオン濃度が上昇して、calcium-activated chloride currentが生じる。これを膜電位の変化としてとらえることが出来る(Kイオン濃度勾配に変化がある場合も同様)。MCHによって生じるSLC-1導入アフリカツメガエル卵母細胞におけるこの反応を観察することによりMCHとSLC-1の結合に影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。

- 氷冷して動けなくなった雌のアフリカツメガエルから取り出した、卵母細胞塊を、MBS液 (88mM NaCl, 1mM KCl, 0.41mM CaCl₂, 0.33mM Ca(NO₃)₂, 0.82mM MgSO₄, 2.4mM NaHCO₃, 10mM HEPES, pH7.4) に溶かしたコラーゲナーゼ(0.5mg/ml)で卵塊がほぐれるまで19℃、1-6時間、150rpmで処理する。外液をMBS液に
- 5 置換することで3度洗浄し、マイクロマニピュレーターでpoly(A)⁺ SLC-1 cRNA (50ng/50nl)をマイクロインジェクションする。SLC-1 mRNAは、組織や細胞から調製しても、プラスミドからin vitroで転写してもよい。これをMBS液中で20℃で3日培養する。これをRinger液を流しているvoltage clamp装置のくぼみに置き、電位固定用ガラス微小電極、電位測定用ガラス微小電極を細胞内
- 10 に刺入し、(-)極は、細胞外に置く。電位が安定したら、MCHもしくはその誘導体またはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を含むRinger液を流して電位変化を記録する。MCHとSLC-1の結合を変化させる化合物の影響は、SLC-1導入アフリカツメガエル卵母細胞の細胞膜電位変化をMCHもしくはその誘導体を単独で投与した場合と比較することによって測定することが
- 15 ができる。このとき、MCHもしくはその誘導体の投与による細胞膜電位変化を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、MCHもしくはその誘導体と同様な細胞膜電位変化を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。
- 20 この系において、反応を変化量を増大して測定しやすいように各種のGタンパク質遺伝子のpoly(A)⁺ RNAを導入することもできる。またaequorinのようなCa存在下で発光を生じるようなタンパクの遺伝子のpoly(A)⁺ RNAを共インジェクションすることにより膜電位変化ではなく発光を観察してこの反応を測定することもできる。
- 25 MCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、SLC-1またはその塩、S

LC-1を含有する細胞、あるいはSLC-1を含有する細胞の膜画分、およびMCHもしくはその誘導体またはその塩を含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものがあげられる。

1. スクリーニング用試薬

5 ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μm のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

10 ②SLC-1 標品

SLC-1を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95% airで2日間培養したもの。

③標識リガンド

[³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識したMCH。

15 適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μM に希釈する。

④リガンド標準液

MCHを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

20 2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養したSLC-1を発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μl の測定用緩衝液を各穴に加える。

② $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5 μl 加えた後、標識したMCHを

25 5 μl 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに 10^{-3} Mのリガンド (MCH) を5 μl 加えておく。

③反応液を除去し、1 ml の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンド (MCH) を0.2 N NaOH-1% SDSで溶解し、4 ml の液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

④液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

〔数1〕

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

10 NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀ : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、MCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合を変化させる (結合を阻害あるいは促進する) 化合物であり、具体的には

15 SLC-1を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩 (いわゆるSLC-1アゴニスト)、あるいは該刺激活性を有しない化合物 (いわゆるSLC-1アンタゴニスト) である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

20 上記SLC-1アゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の (i) または (ii) に従えばよい。

(i) 前記①～③のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、MCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合性を変化させる (特に、結合を阻害する) 化合物を得た後、該化合物が上記したSLC-1

25 を介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩はSLC-1アゴニストであり、該活性を有しない化合物

またはその塩はSLC-1アンタゴニストである。

(ii) (a) 試験化合物をSLC-1を含有する細胞に接触させ、上記SLC-1を介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩はSLC-1アゴニストである。

- 5 (b) SLC-1を活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチドまたはSLC-1アゴニストなど）をSLC-1を含有する細胞に接触させた場合と、SLC-1を活性化する化合物および試験化合物をSLC-1を含有する細胞に接触させた場合における、SLC-1を介した細胞刺激活性を測定し、比較する。SLC-1を活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させ得る化合物
- 10 物またはその塩はSLC-1アンタゴニストである。

該SLC-1アゴニストは、SLC-1に対するMCHまたはその塩が有する生理活性と同様の作用を有しているので、MCHまたはその塩と同様に安全で低毒性な医薬として有用である。

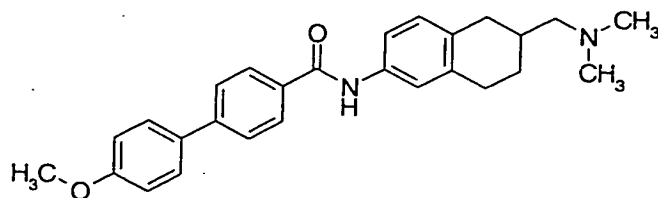
- 逆に、SLC-1アンタゴニストは、SLC-1に対するMCHまたはその塩が有する生理活性を抑制することができるので、該レセプター活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。
- 15

- MCHまたはその塩は食欲（摂食）増進作用およびオキシトシン分泌促進作用などに関与していることから、食欲（摂食）増進剤またはオキシトシン分泌促進剤などとして用いることができるため、上記のスクリーニング方法または
- 20 スクリーニング用キットを用いて得られる化合物のうち、SLC-1アゴニストは食欲（摂食）増進剤として用いることができる他、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞、神経性食欲不振症などの食欲不振およびそれに伴う貧血、低蛋白症などの予防・治療薬などとして用いることができ、SLC-1アンタゴニストは抗肥満剤（薬）
- 25 、食欲（摂食）調節剤などとして用いることができる他、過強陣痛、強直性子宮収縮、胎児仮死、子宮破裂、頸管裂傷、早産、Prader-Willi症候群、糖尿病お

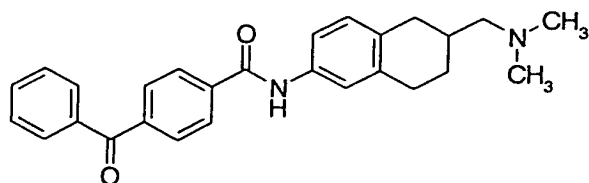
よびその合併症（糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、糖尿病性神経障害など）、高血圧、高脂血症、冠状動脈硬化症、痛風、呼吸器疾患（Pickwick症候群、睡眠時無呼吸症候群）、脂肪肝、不妊症、変形性骨関節症など（特に抗肥満剤（薬）、食欲（摂食）調節剤など）の予防・治療薬などとして用いることができる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物として具体的には、例えば日本国特許出願、特願平11-357889号に記載の以下の（1）～（42）に記載の化合物などがあげられる。

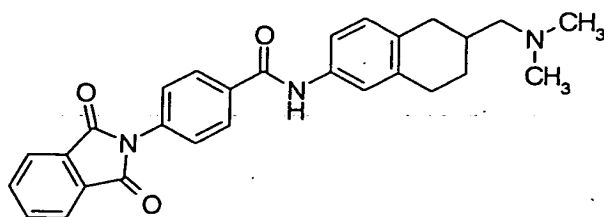
（1） N-[2-(N,N-ジメチルアミノ)メチル-6-テトラリニル]-(4'-メトキシ
10 ビフェニル-4-イル) カルボキサミド



（2） 4-ベンゾイル-N-[2-(N,N-ジメチルアミノ)メチル-6-テトラリニル]ベンズアミド

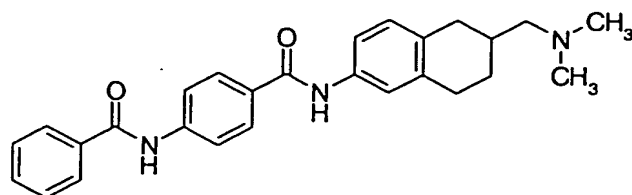


15 （3） N-[2-(N,N-ジメチルアミノ)メチル-6-テトラリニル]-4-(1,3-ジオキソ-1,3-ジヒドロ-2H-イソインドール-2-イル)ベンズアミド

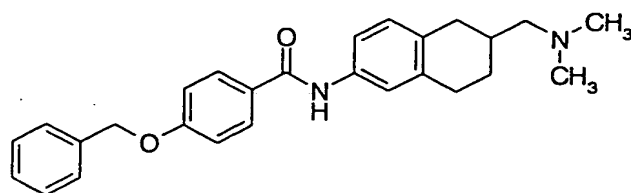


（4） 4-(ベンゾイルアミノ)-N-[2-(N,N-ジメチルアミノ)

メチルー 6-テトラリニル] ベンズアミド

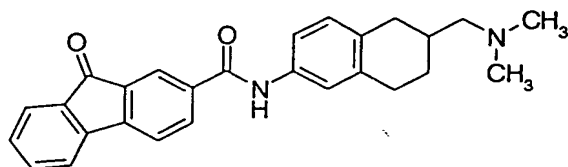


(5) 4-(ベンジルオキシ)-N-[2-(N,N-ジメチルアミノ)メチルー 6-テトラリニル] ベンズアミド

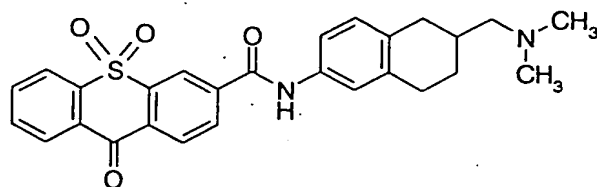


5

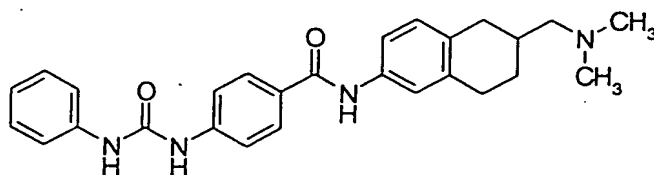
(6) N-[2-(N,N-ジメチルアミノ)メチルー 6-テトラリニル]-9-オキソ-9H-フルオレン-2-カルボキサミド



(7) N-[2-(N,N-ジメチルアミノ)メチルー 6-テトラリニル]-9,10,10-トリオキソ-9,10-ジヒドロ-10¹⁶-チオキサントレン-3-カルボキサミド

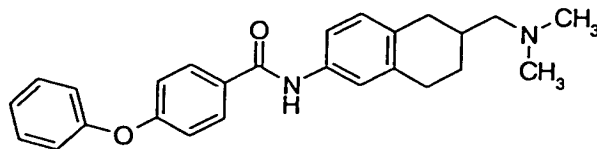


(8) (4-アニリノカルボニル) アミノ-N-[2-(N,N-ジメチルアミノ)メチルー 6-テトラリニル] ベンズアミド

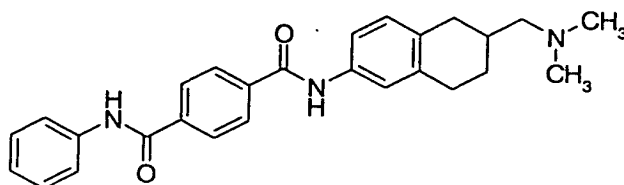


15

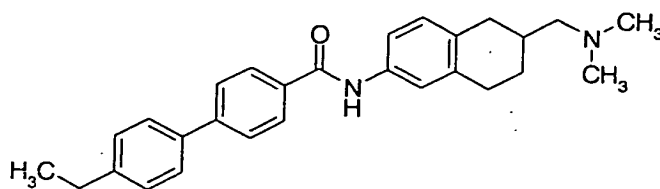
(9) N-[2-(N,N-ジメチルアミノ)メチル-6-テトラリニル]-4-フェノキシベンズアミド



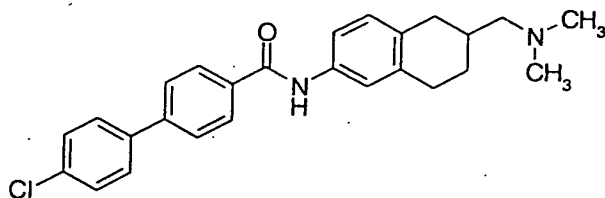
(10) N¹-[2-(N,N-ジメチルアミノ)メチル-6-テトラリニル]-N⁴-フェニルテレフタルアミド



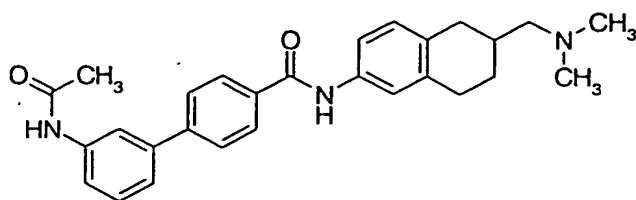
(11) (4'-エチルビフェニル-4-イル)-N-[2-(N,N-ジメチルアミノ)メチル-6-テトラリニル]カルボキサミド



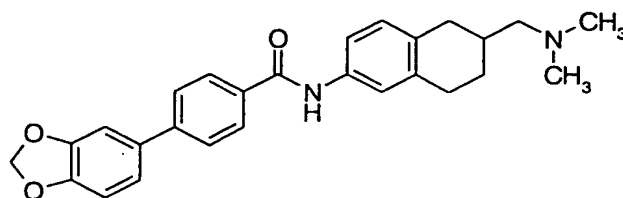
10 (12) (4'-クロロビフェニル-4-イル)-N-[2-(N,N-ジメチルアミノ)メチル-6-テトラリニル]カルボキサミド



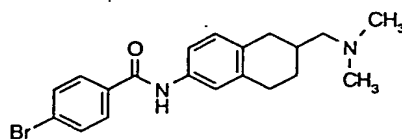
(13) (4'-アセチルアミノビフェニル-4-イル)-N-[2-(N,N-ジメチルアミノ)メチル-6-テトラリニル]カルボキサミド



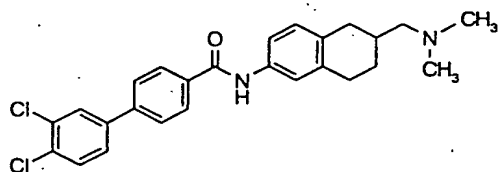
(14) 4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル) -N-[2-(N,N-ジメチルアミノ)メチル-6-テトラリニル]ベンズアミド



5 (15) 4-ブromo-N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]ベンズアミド

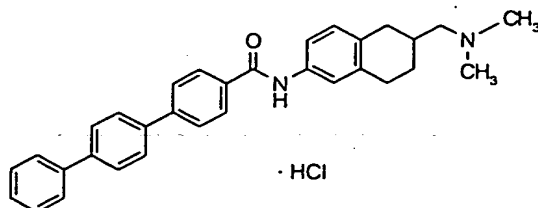


(16) 3',4'-ジクロロ-N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル][1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド

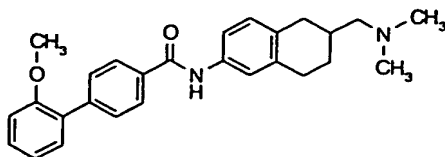


10

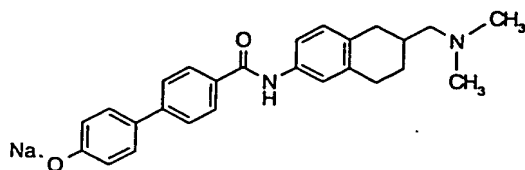
(17) N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]-4'-フェニル[1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド 塩酸塩



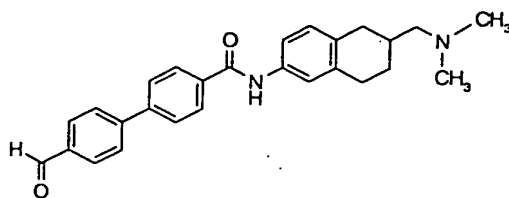
15 (18) N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]-2'-メトキシ[1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド



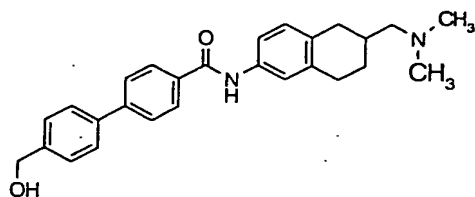
(19) N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]-4'-オキシ[1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド ナトリウム塩



5 (20) N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]-4'-ホルミル[1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド

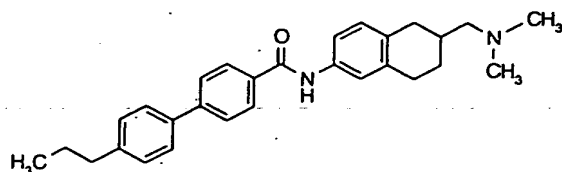


(21) N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]-4'-(ヒドロキシメチル)[1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド

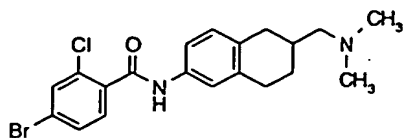


10

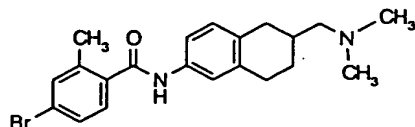
(22) N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]-4'-プロピル[1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド



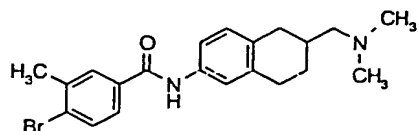
15 (23) 4-ブromo-2-クロロ-N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]ベンズアミド



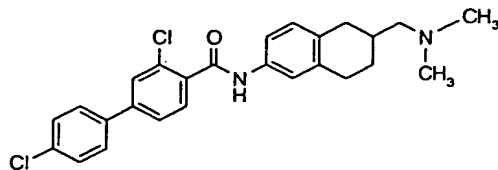
(24) 4-ブromo-N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]-2-メチルベンズアミド



5 (25) 4-ブromo-N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]-3-メチルベンズアミド

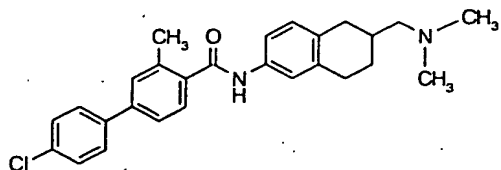


(26) 3,4'-ジクロロ-N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル][1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド



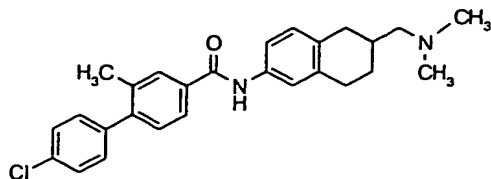
10

(27) 4'-クロロ-N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]-3-メチル[1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド

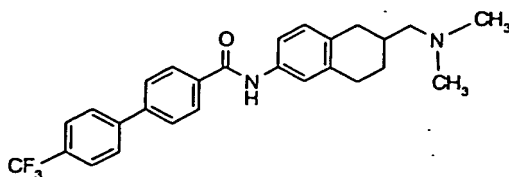


(28) 4'-クロロ-N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒ

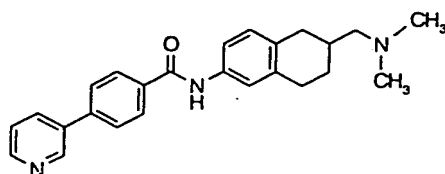
15 ドロ-2-ナフタレニル]-2-メチル[1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド



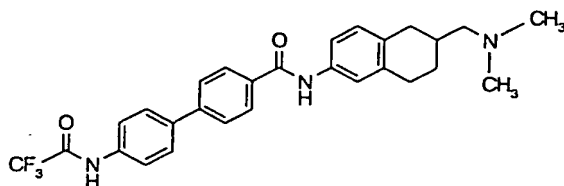
(29) N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]-4'-(トリフルオロメチル)[1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド



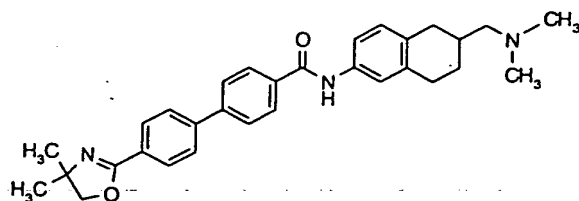
(30) N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]-4-(3-ピリジニル)ベンズアミド



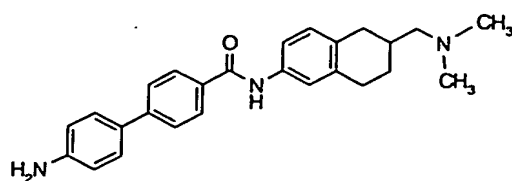
(31) N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]-4'-[(トリフルオロアセチル)アミノ][1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド



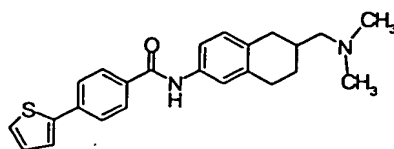
(32) N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]-4'-(4,4-ジメチル-4,5-ジヒドロ-1,3-オキサゾール-2-イル)[1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド



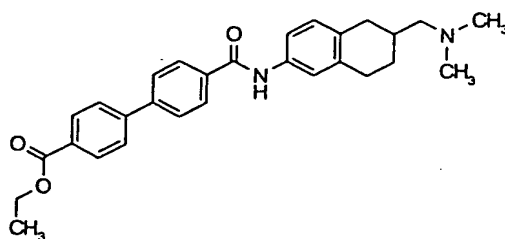
(33) 4'-アミノ-N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル][1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド



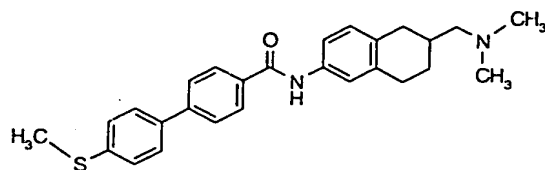
(34) N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]-4-(2-チエニル)ベンズアミド



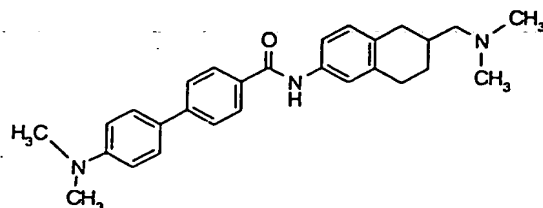
5 (35) エチル 4'-[[[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]アミノ]カルボニル][1,1'-ビフェニル]-4-カルボキシレート



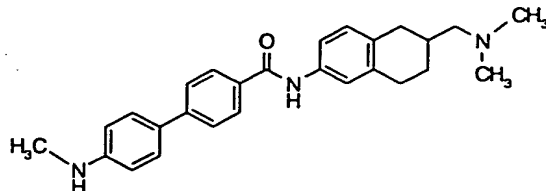
10 (36) N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]-4'-(メチルスルファニル)[1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド



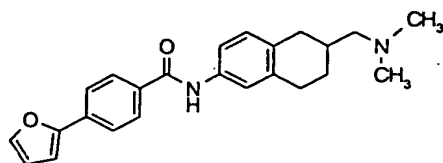
(37) 4'-(N,N-ジメチルアミノ)-N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル][1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド



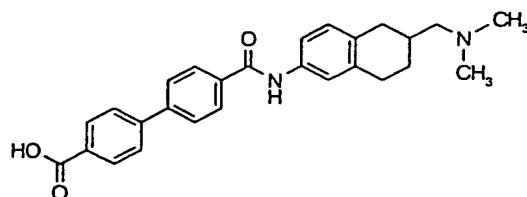
(38) N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]-4'-(メチルアミノ)[1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド



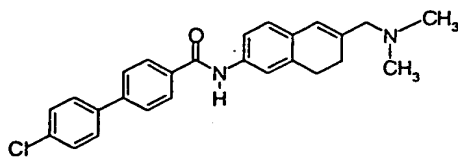
(39) N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]-4-(2-フリル)ベンズアミド



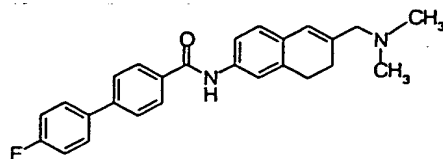
(40) 4'-[[[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレニル]アミノ]カルボニル][1,1'-ビフェニル]-4-カルボン酸



(41) 4'-クロロ-N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-7,8-ジヒドロ-2-ナフタレニル][1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド



(42) 4'-フルオロ-N-[6-[(N,N-ジメチルアミノ)メチル]-7,8-ジヒドロ-2-ナフタレニル][1,1'-ビフェニル]-4-カルボキサミド



上記(1)の化合物(N-[2-(N,N-ジメチルアミノ)メチル-6-テトラリニル]- (4'-メトキシビフェニル-4-イル)カルボキサミド)のアゴニスト活性を後述の実施例21に記載の方法に従って測定し、結合阻害率(%)を(化合物とMCHを添加したときの放射活性-DMSO溶液を添加したときの放射活性)

- 5 / (MCHを添加したときの放射活性-DMSO溶液を添加したときの放射活性) $\times 100$ で算出し、該結合阻害率(%)から該化合物の IC_{50} (nM)を算出したところ、上記(1)の化合物(N-[2-(N,N-ジメチルアミノ)メチル-6-テトラリニル]- (4'-メトキシビフェニル-4-イル)カルボキサミド)の IC_{50} (nM)は40となり、上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物(アンタゴニスト)であることが証明された。
- 10

上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容可能な塩などが用いられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などがあげられる。

- 15 無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などがあげられる。

- 有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2,6-ピリジンジールアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩などがあげられる。
- 20

無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などとの塩があげられる。

- 25 有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタ

ンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸などとの塩があげられる。

塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルチニンなどとの塩があげられ、酸性アミノ酸との好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩があげられる。

- 5 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬として使用する場合、上記の本発明のポリペプチドを医薬として実施する場合と同様にして実施することができる。

- 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬として使用する場合、常套手段に従って実施
10 することができる。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、
15 結合剤などとともに一般に認められた単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶
20 性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのよ
うな香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記
25 タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実

施にしたがって処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート 80 (TM)、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

10 また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

15 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.1 から 1000 mg、好ましくは約 1.0 から 300 mg、より好ましくは約 3.0 から 50 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形で成人の肥満症患者（体重 60 kg として）への投与においては、SLC ア
25 ンタゴニストを一日につき約 0.01 から 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 から 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 から 10 mg 程度を静脈注射によ

り投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
10	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
	Y	: チミンまたはシトシン
15	N	: チミン、シトシン、アデニンまたはグアニン
	R	: アデニンまたはグアニン
	M	: シトシンまたはアデニン
	W	: チミンまたはアデニン
	S	: シトシンまたはグアニン
20	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
25	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸

	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	TFA	: トリフルオロ酢酸
	EIA	: エンザイムイムノアッセイ
5	GlyまたはG	: グリシン
	AlaまたはA	: アラニン
	ValまたはV	: バリン
	LeuまたはL	: ロイシン
	IleまたはI	: イソロイシン
10	SerまたはS	: セリン
	ThrまたはT	: スレオニン
	CysまたはC	: システイン
	MetまたはM	: メチオニン
	GluまたはE	: グルタミン酸
15	AspまたはD	: アスパラギン酸
	LysまたはK	: リジン
	ArgまたはR	: アルギニン
	HisまたはH	: ヒスチジン
	PheまたはF	: フェニルアラニン
20	TyrまたはY	: チロシン
	TrpまたはW	: トリプトファン
	ProまたはP	: プロリン
	AsnまたはN	: アスパラギン
	GlnまたはQ	: グルタミン
25	pGlu	: ピログルタミン酸
	Me	: メチル基

	Et	: エチル基
	Bu	: ブチル基
	Ph	: フェニル基
	TC	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
5	Bom	: ベンジルオキシメチル
	NMP	: N-メチルピロリドン
	PAM	: フェニルアセトアミドメチル

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

10	Tos	: p-トルエンスルフォニル
	HONB	: N-ヒドロキシー-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
	Bzl	: ベンジル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
15	Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	Cl-Z	: 2-クロルベンジルオキシカルボニル
	Boc	: t-ブチルオキシカルボニル
	HOBT	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
20	TFA	: トリフルオロ酢酸
	Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	DNP	: ジニトロフェニル
	Bum	: ターシャリープトキシメチル
	Trt	: トリチル
25	BSA	: ウシ血清アルブミン
	CHAPS	: 3-[(3-コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ]

— 1 —プロパンスルホナート

PMSF : フェニルメチルスルホニルフルオリド

E 6 4 : (L-3-trans-カルボキオキシラン-2-カルボニル) L-ロイシル-アグマチン

5 GDP : グアノシン-5'-ニリン酸

MEM α : ミニマムエッセンシャルメジウムアルファ

F u r a - 2 A M : 1-[6-アミノ-2-(5-カルボキシ-2-オキサゾリル)-5-ベンゾフラニロキシ]-2-(2-アミノ-5メチルフェノキシ)-エタン-N, N, N', N'-四酢酸ペンタアセトキシメチルエステル

10 HBSS : ハンクス平衡塩液

F l u o - 3 A M : 1-[2-アミノ-5-(2, 7-ジクロロ-6-ヒドロキシ-3-オキシ-9-キサンテニル)フェノキシ]-2-(2-アミノ-5-メチルフェノキシ)エタン-N, N, N', N'-四酢酸ペンタアセトキシメチルエステル

15 HEPES : 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸

Me B z l : 4-メチルベンジル

NMP : N-メチルピロリドン

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

20 ラット脳から精製されたSLC-1に対するリガンドペプチドのN末端アミノ酸配列解析の結果から得られたアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

ラットMCHとして同定されたラット脳から精製されたSLC-1に対するリガンドペプチドのアミノ酸配列を示す。

25 〔配列番号：3〕

ラットSLC-1をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：4〕

ラットSLC-1をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：5〕

ラットSLC-1の全アミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号：6〕

5'側にSal I認識配列が付加され、また3'側にSpe I認識配列が付加されたラットSLC-1cDNAの全塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

10 ラットSLC-1発現CHO細胞の各クローンにおけるSLC-1mRNAの発現量を測定するために使用したリボプローブ (riboprobe) を示す。

〔配列番号：8〕

ヒトSLC-1をコードするcDNAを取得するために使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：9〕

ヒトSLC-1をコードするcDNAを2本鎖にするために使用したプライマーを示す。

15 〔配列番号：10〕

ヒトSLC-1をコードするcDNA全塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕

ヒトSLC-1の全アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：12〕

20 ヒトSLC-1(S)をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：13〕

ヒトSLC-1(S)をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：14〕

ヒトSLC-1(L)をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

25 〔配列番号：15〕

ヒトSLC-1(L)をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：16〕

5'側にSal I認識配列が付加され、また3'側にSpe I認識配列が付加されたヒトSLC-1(S) cDNAの全塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕

- 5 5'側にSal I認識配列が付加され、また3'側にSpe I認識配列が付加されたヒトSLC-1(L) cDNAの全塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

ヒトSLC-1(S) 発現CHO細胞およびヒトSLC-1(L) 発現CHO細胞の各クローンにおけるSLC-1mRNAの発現量を測定するために使用したリボプローブ (riboprobe)

- 10 を示す。

〔配列番号：19〕

Des-Asp¹-MCH (MCH(2-19))のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：20〕

Des-[Asp¹, Phe²]-MCH (MCH(3-19))のアミノ酸配列を示す。

- 15 〔配列番号：21〕

Des-[Asp¹, Phe², Asp³]-MCH (MCH(4-19))のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：22〕

Des-[Asp¹, Phe², Asp³, Met⁴]-MCH (MCH(5-19))のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：23〕

- 20 Des-[Asp¹, Phe², Asp³, Met⁴, Leu⁵]-MCH (MCH(6-19))のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：24〕

Des-[Asp¹, Phe², Asp³, Met⁴, Leu⁵, Arg⁶]-MCH (MCH(7-19))のアミノ酸配列を示す。

- 25 実施例8で得られた配列番号：11で表される塩基配列をコードするDNAを含むプラスミドによる形質転換体 Escherichia coli DH10B/phSLC1L8は、1999年2月1日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH)

に寄託番号FERM BP-6632として、1999年1月21日から財団法人・発酵研究所（IFO）に寄託番号IFO 16254として寄託されている。

5 実施例

以下に実施例および参考例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

参考例1 ラット脳抽出物に含まれ、CHO/SLC-1細胞のcAMP合成を特異的に抑制する活性の検出

ラット脳抽出物の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）フラクションを以下に述べる方法で調製した。チャールズリバー（株）より購入した、100匹のウィスターラット（雄、8週令）から脳を取り出し、直ぐに沸騰した蒸留水0.8lに投じて10分間煮沸した。煮沸後、直ちに氷冷し、48 mlの酢酸を加えて終濃度1.0 Mとし、ポリトロン（20,000 rpm、6分間）を用いて破碎した。破碎液を遠心（8,000 rpm、30分）して上清を取り、沈殿には1.0 M酢酸0.8 lを加えて再度ポリトロンによって破碎し、遠心（8,000 rpm、30分）して上清を取った。沈殿には1.0 M酢酸0.8 lを加えて再度ポリトロンによって破碎し一晩攪拌した後、遠心（8,000 rpm、30分）して上清を得た。上清に2倍量の冷アセトンでゆっくり滴下した後、1回目の遠心によって得た上清については一晩攪拌し、2回目の遠心によって得た上清については4時間攪拌した。アセトンを加えた抽出液は遠心（8,000 rpm、30分）して沈殿を除き、得られた上清からエバポレーターによって減圧下にアセトンを溜去した。アセトンを除いた抽出液に等量のジエチルエーテルを加え、分液ロートを使って脂質を含むエーテル層を分離して水層を回収した。エーテル脱脂した抽出液はエバポレーターによって減圧下に濃縮してエーテルを完全に除去した。濃縮液をガラス繊維濾紙（アドバン

- テック、DP70 (90 mmφ)) で濾過し、濾液をガラス製カラム (20mmφ x 240 mm) に充填したC18 (ワイエムシー、YMCgel ODS-AM 120-S50) カラムに添加した。カラムを1.0 M酢酸300 mlで洗浄後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む60%アセトニトリル300 mlで溶出した。溶出液を減圧化に濃縮して溶媒を溜去した後、
- 5 濃縮液を凍結乾燥した。凍結乾燥品約0.24 gを5mlのDMSOに溶解し、次に1.0 M酢酸45mlを加えてラット脳抽出標品とした。ラット脳抽出標品を1.0 M酢酸で平衡化したSP-Sephadex C-25カラム (アマシャムファルマシアバイオテック、ゲル体積:100ml) に添加し、1.0 M酢酸50mlで洗浄した後、2.0Mピリジン100ml溶出画分と2.0Mピリジン・酢酸100ml溶出画分を順次得た。2.0Mピリジン・酢酸溶
- 10 出液を減圧化に濃縮して溶媒を溜去した後、濃縮液を凍結乾燥した。凍結乾燥品約100mgを10 mlの0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリルに溶解し、C18カラム (トーソー、TSKgel ODS-80T₃ (21.5φ x 300 mm)) を用いた10%から60%の0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度勾配溶出法によるHPLCにかけた。各分画を減圧下に濃縮・乾固し、残渣を0.2 mlのジメチルスルフォキシド (DMSO) で溶解した。
- 15

- 実施例4で作製したCHO/SLC-1細胞およびmock CHO細胞を24穴プレートに5 x 10⁴ cell/wellで播種し、48時間培養した。細胞を0.2mM 3-イソブチルメチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー (pH7.4) で洗浄した (以下、0.2mM 3-イソブチルメチルキサンチンと0.05% BSAと20mM
- 20 HEPESを含むハンクスバッファー (pH7.4) を、反応用バッファーと呼ぶ)。その後0.5mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温した。反応用バッファーを除き、新たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、HPLCフラクションと2μMフォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファーを細胞に加え、37℃で24分間反応させた。100μlの20%過塩素酸を加えて反応を停止させ、次に氷上で1時間置くことにより細胞内cAMPを抽出した。抽出液中のcAMP
- 25 量は、cAMP EIAキット (アマシャムファルマシアバイオテック) を用いて測定し

た。その結果、分画番号33, 34, 35にCHO/SLC-1細胞特異的なcAMP合成抑制活性が検出された(図1)。図1中、cAMP合成抑制活性は、フォルスコリンを含む反応用バッファを添加したときの細胞内cAMP量から反応用バッファを添加したときの細胞内cAMP量を減じた量を100%として、HPLCフラクション(各フラク
5 ションをDMSOで100倍希釈した溶液を1 μ l添加した)を加えたときの細胞内cAMP量から反応用バッファを添加したときの細胞内cAMP量を減じた量を%として表わした。

10 参考例2 ラット脳抽出物中のラットSLC-1発現CHO細胞に対して特異的にcAMP合成抑制活性を示す活性物質のプロナーゼによる失活

参考例1でCHO/SLC-1細胞に対するcAMP合成抑制活性を示したHPLC分画34を蛋白分解酵素であるプロナーゼ(Sigma, protease Type XIV (P5147))で処理し、活性物質が蛋白性であるかを調べた。

上記ラット脳抽出物HPLC分画(#34)2 μ lを0.2 M酢酸アンモニウム100 μ l
15 に加え、これにプロナーゼ3 μ gを添加して37℃で2時間インキュベートした後、沸騰水中で10分間加熱してプロナーゼを失活させた。これにBSA 0.05mgおよびCHAPS 0.05 mgを含む蒸留水2 mlを加えてから凍結乾燥した。プロナーゼそのものあるいは加熱および凍結乾燥の影響を調べるため、プロナーゼのみ、HPLC分画のみおよびプロナーゼのみを加熱処理した後にHPLC分画を加えたものにつ
20 いても同様に処理して凍結乾燥した。凍結乾燥した各試料を2 μ Mフォルスコリンを含む反応用バッファで溶解し、参考例1に示す方法によってCHO/SLC-1細胞に添加してcAMP合成抑制活性を測定した。結果を図2に示した。ラット脳抽出物中のCHO/SLC-1細胞に対するcAMP合成抑制活性を示す活性物質はプロナーゼによって完全に失活したことからこの物質が蛋白もしくはペプチドであることが
25 が示された。

参考例3 ラット脳からのラットSLC-1/CHO細胞に対して特異的にcAMP合成抑制活性を示す活性物質の精製

CHO/SLC-1細胞に対して特異的にcAMP合成抑制活性を示す活性物質をラット脳から精製した代表例を以下に具体的に述べる。

- 5 参考例1で活性を認めた分画33を以下のように精製した。活性分画を減圧下に濃縮して溶媒を除いた後、凍結乾燥した。これを10%アセトニトリルを含む10 mMギ酸アンモニウム(pH 5.25)5mlに溶解し、陽イオン交換カラム(トーソー、TSKgel CM-2SW (4.6 mmφ x 150 mm))に添加した後、10%アセトニトリルを含む10 mMから500 mMのギ酸アンモニウム(pH 5.25)の濃度勾配によって活性物質を溶出した。活性はギ酸アンモニウム320 mM付近に回収された。活性分画2ml
- 10 に0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリル2.5mlを加え、ジフェニルカラム(セパレーショングループ、Vydac 219-TP54)に添加した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む27.5%から42.5%のアセトニトリルの濃度勾配によって溶出した。活性はアセトニトリル31.3%付近に出現した。活性分画0.96mlに0.1%
- 15 トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリル4.4mlを加え、ODSカラム(野村化学、Develosil ODS-UG-3)に添加した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む27.5%から42.5%のアセトニトリルの濃度勾配によって溶出した。溶出液はピーク毎に手動で分取した。活性はアセトニトリル36.8%付近(フラクションNo. 16)に単一ピークとして出現した。(図3)。

20

参考例4 ラット脳から精製されたラットSLC-1発現CHO細胞に対して特異的にcAMP合成抑制活性を示す活性物質のラットMCHとしての同定

参考例3で精製されたラットSLC-1発現CHO細胞に対して特異的にcAMP合成抑制活性を示す活性物質の構造解析を行なった。本活性物質は参考例2に示すように蛋白またはペプチドであることが推定されていたので、活性ピークを含む溶出液を用いてベックマン社LF3400 Protein Sequencerによるアミノ末端アミ

25

ノ酸配列分析を行なった。分析の結果、配列番号：1に示す配列が得られた。7
 残基目と16残基目には配列分析の反応中にCys残基から生成した
 dehydroalanineのPTH誘導体が検出され、Cysであると決定された。この配列は
 ラットメラニン凝集ホルモン(melanin-concentrating hormone, MCH)のN末端か
 5 ら16残基までのアミノ酸配列に一致した。そこで本活性物質をJEOL HX110によ
 る質量分析計によって測定したところラットMCHの分子量とほぼ一致するm/z
 2387.3にシグナルが観察されたことから、活性物質の推定アミノ酸配列として
 ラットMCHの配列(配列番号：2)が決定された。なお、参考例3で得られた活
 性分画34および35についても生成を行なって活性物質を得たが、いずれの活性
 10 もラットMCHであることが確認された。さらに、ペニンスラ社から購入したラッ
 トMCHはラットSLC-1発現細胞に対し、実施例5に述べる方法で行なったcAMP産
 生抑制活性のアッセイにおいて用量依存的に抑制活性を示し、本活性物質がラ
 ットMCHであることが確認された。

15 実施例1 ラット脳由来cDNAを用いたPCR法によるラットSLC-1 受容体cDNAの増幅

ラット脳由来poly (A) ⁺RNA (クローンテック社)を鋳型とし、ランダムプライ
 イマーを用いて逆転写反応を行なった。逆転写反応は、タカラRNA PCR ver. 2
 キットの試薬を使用した。次にこの逆転写生成物を鋳型として用い、配列番号
 20 : 3および4の合成DNAプライマーを用いてPCR法による増幅を行なった。合成
 DNAプライマーは受容体蛋白に翻訳される領域の遺伝子が増幅されるように構
 築したが、その際に遺伝子の5'側に制限酵素Sal Iの認識する塩基配列が付加さ
 れ、また3'側に制限酵素Spe Iの認識する塩基配列が付加されるように、5'側お
 よび3'側にそれぞれの制限酵素の認識配列を付加した。反応液の組成は、cDNA
 25 鋳型5 μ l、合成DNAプライマー各0.4 μ M、0.25 mM dNTPs、pfu (ストラタジ
 ー社) DNAポリメラーゼ0.5 μ lおよび酵素に付属のバッファーで、総反応量は

50 μ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー社）を用い、94℃・60秒の加熱の後、94℃・60秒、60℃・30秒、72℃・150秒のサイクルを35回繰り返し、最後に72℃で10分間反応させた。増幅産物の確認は、0.8%アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムブロマイド染色によって行な

5 った。

実施例2 PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入cDNA部分の塩基配列の解読による増幅cDNA配列の確認

実施例1で行なったPCR後の反応産物は0.8%の低融点アガロースゲルを用

10 いて分離し、バンドの部分をカミソリで切り出した後、細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なってDNAを回収した。PCR-Script™ Amp SK⁽⁺⁾クローニングキット（ストラタジーン社）の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR-Script Amp SK⁽⁺⁾へサブクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) XL-1 Blue（ストラ

15 ジーン）に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体*E. coli* XL-1 Blue/ラットSLC-1を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIA prep8 mini prep（キアゲン社）を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部

20 部を用いて制限酵素Sal IおよびSpe Iによる切断を行ない、挿入されている受容体cDNA断片の大きさを確認した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequence Kit（パーキンエルマー社）を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。得られた3クローンの配列を解析し全ての配列が報告されているラットSLC-1タンパク質（配列番号：5）をコードする

25 cDNA配列（Lakaye, B. et al. Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1401, pp. 216-220 (1998), accession No. AF08650）の5'側にSal I認識配列が付加し、3'側にSpe I

認識配列が付加した遺伝子配列と一致することを確認した（配列番号：6）。

実施例3 ラットSLC-1発現CHO細胞の作製

実施例2で配列が確認されたラット脳由来のSLC-1の全長アミノ酸配列をコードし、5'側にSal I認識配列が付加し、また3'側にSpe I認識配列を付加した遺伝子が導入されたプラスミドによって形質転換されたE. coliのクローンより Plasmid Midi Kit（キアゲン社）を用いてプラスミドを調製し、制限酵素Sal I およびSpe Iで切断してインサート部分を切り出した。インサートDNAは電気泳動後、アガロースゲルからカミソリで切り出し、次に細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なって回収した。このインサートDNAをSal IおよびSpe Iで切断した動物細胞発現用ベクタープラスミドpAKK0-111H（Hinuma, S. et al. Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1219, pp. 251-259 (1994)記載のpAKK01. 11Hと同一のベクタープラスミド）に加え、T4ライゲース（宝酒造）を用いてライゲーションを行ない、蛋白発現用プラスミドpAKK0-SLC-1を構築した。

pAKK0-SLC-1で形質転換したE. coli DH5（トーヨーボー）を培養後、Plasmid Midi Kit（キアゲン社）を用いてpAKK0-SLC-1のプラスミドDNAを調製した。これをCellPfect Transfection Kit（アマシヤムファルマシアバイオテック社）を用い添付のプロトコルに従ってCHO dhfr⁻細胞に導入した。10 μ gのDNAをリン酸カルシウムとの共沈懸濁液とし、24時間前に 5×10^5 または 1×10^6 個のCHO dhfr⁻細胞を播種した10 cmシャーレに添加した。10%ウシ胎児血清を含むMEM α 培地で1日間培養した後、継代し、選択培地である10%透析ウシ胎児血清を含む核酸不含MEM α 培地で培養した。選択培地中で増殖してくるSLC-1発現CHO細胞である形質転換細胞のコロニー56クローンを選択した。

実施例4 全長ラットSLC-1レセプター蛋白質mRNAの発現量の高いCHO/ SLC-1細

胞株の選択

実施例 3 で樹立されたCHO/ SLC-1株56クローンの全長ラットSLC-1レセプター蛋白質mRNAの発現量をCytostar T Plate (アマシャムファルマシアバイオテク社) を用い、添付のプロトコルに従って以下のように測定した。CHO/ SLC-1株
 5 の各クローンをCytostar T Plateの各wellに 2.5×10^4 個ずつ播種して24時間培養した後、10%ホルマリンによって細胞を固定した。各wellに0.25% Triton X-100を添加して細胞の透過性をあげた後、 ^{35}S ラベルした配列番号: 7 の riboprobeを加えてハイブリダイズさせた。20 mg/mlのRNaseAを各wellに加えて遊離のriboprobeを消化し、プレートをよく洗浄した後、ハイブリダイズした
 10 riboprobeの放射活性をTopcounterで測定した。放射活性の高い株がmRNA発現量が高い。mRNA発現量の高い3クローン (#3, 6および44) を以下の実験に用いたが、特にクローン番号44を主に用いた (図4)。

実施例 5 MCHによるラットSLC-1発現CHO細胞に対するcAMP合成抑制活性

15 合成MCH (ペニンスラ社) を種々の濃度に希釈し、ラットSLC-1発現CHO細胞に対するcAMP合成抑制活性を以下に示す方法で測定した。実施例 4 で選択したCHO/SLC-1細胞を24穴プレートに 5×10^4 cell/wellで播種し、48時間培養した。細胞を0.2mM 3-イソブチルーメチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)で洗浄した (以下、0.2mM 3-イソブチルー
 20 メチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)を、反応用バッファーと呼ぶ)。その後0.5mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温した。反応用バッファーを除き、新たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、種々の量のMCHと $2 \mu\text{M}$ フォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファーを細胞に加え、 37°C で24分間反応させた。100 μl の20%過塩素
 25 酸を加えて反応を停止させ、次に氷上で1時間置くことにより細胞内cAMPを抽出した。抽出液中のcAMP量は、cAMP EIAキット (アマシャムファルマシアバイ

オテク)を用いて測定した。その結果、MCHは0.1nMの濃度で明らかに細胞内cAMP量を低下させ、さらにペプチド濃度を増やすと容量依存的に細胞内cAMP量は減少した(図5)。図中、cAMP合成抑制活性は、フォルスコリンを含む反応用バッファーを添加したときの細胞内cAMP量から反応用バッファーを添加したときの細胞内cAMP量を減じた量を100%として、MCHを加えたときの細胞内cAMP量から反応用バッファーを添加したときの細胞内cAMP量を減じた量を%として表わした。

実施例6 MCHがラットSLC-1発現CHO細胞に対して惹起するアラキドン酸代謝物放出活性

種々の濃度の合成MCH(ペニン斯拉社)が示すラットSLC-1発現CHO細胞に対するアラキドン酸代謝物放出活性を以下の方法により測定した。実施例4で選択したCHO/SLC-1細胞を24穴プレートに 5×10^4 cell/wellで播種し、24時間培養後、 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸を0.25 $\mu\text{Ci/well}$ となるよう添加した。 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸添加16時間後、細胞を0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)で洗浄し、各wellに0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)に溶解した種々の濃度の合成ラットMCH500 μl を添加した。以降、0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)を反応バッファーと呼ぶ。37℃で60分間インキュベートした後に、反応液400 μl をシンチレーターに加え、反応液中に遊離した $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量をシンチレーションカウンターにより測定した。合成ラットMCH3nM濃度で明らかなアラキドン酸代謝物放出が起こり、さらにペプチド濃度を増やすと容量依存的にアラキドン酸代謝物が培地中に放出された(図6)。図中、アラキドン酸代謝物放出活性は、合成ラットMCH非添加反応バッファーによる培地中の $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量を100%としたときの、合成ラットMCH添加反応バッファーによる培地中の $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量の相対値で示した。

実施例7 ヒトSLC-1 cDNAを含むプラスミドの単離

ヒト胎児脳由来cDNA library (SUPERScript™ cDNA Library; GIBCOBRL社)を、Genetrapp^{er} cDNA positive selection system (GIBCOBRL社)のマニュアルに従って、ファージ Fl エンドヌクレアーゼを用いて、DNAにnickを入れた後、エシエリヒア コリ エキソヌクレアーゼ IIIで消化することにより、1本鎖ヒト胎児脳由来cDNA libraryを調製した。

Kolakowski Jr. ら (Kolakowski Jr., et al (1996) FEBS Lett. Vol. 398, pp. 253-258) の報告に基づいて作製した配列番号: 8 の合成オリゴヌクレオチド (accession No. U71092 の1434-1451に相当) の3'末端に biotin-14-dCTP を Terminal Deoxynucleotidyl Transferaseを用いて付加し、biotin化オリゴヌクレオチドを調製した。反応液の組成、反応時間はマニュアルに従った。

1本鎖ヒト胎児脳由来cDNA library 4 μ gを95℃で1分保温した後、氷上で急冷し、biotin化オリゴヌクレオチド20 ngを加え、37℃で1時間、添付ハイブリダイゼーションバッファーでハイブリダイズした。ストレプトアビジンビーズを加え、MAGNA-SEP Magnetic Particle Separator (GIBCOBRL社)を用いて、biotin化オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした1本鎖ヒト胎児脳由来cDNAを単離し、Kolakowski Jr. らの報告 (Kolakowski Jr., et al (1996) FEBS Lett. Vol. 398, pp. 253-258) に基づいて作製した配列番号: 9 の合成オリゴヌクレオチド (accession No. U71092の1011-1028に相当) 50ngをプライマーにしてマニュアルに従って相補鎖を合成し、2本鎖プラスミドとした。

実施例8 単離したヒトSLC-1 cDNAを含むプラスミドの塩基配列の決定

実施例7で得られたプラスミドをELECTROMAX™DH10B™Cellsにエレクトロポレーション法で導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン及びX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅

菌したつま楊枝でつついて分離し、形質転換体 *E. coli*. DH10B/hSLC-1を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIA prep8 mini prep (キアゲン社)を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応は、DyeDeoxy Terminator Cycle Sequence Kit (パーキンエルマー社)を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。その結果、配列番号：10に示す配列が得られた。ここに得られた塩基配列がコードするアミノ酸配列(配列番号：11)は、Lakayeらの報告(Lakaye, B. et al. (1998) Biochem. Biophys. Acta, vol. 1401, pp. 216-220)において、ヒトSLC-1の配列を含むヒト染色体DNA配列(accession number: Z86090)をもとにしてラットSLC-1から類推された配列として推定されていたヒトSLC-1アミノ酸配列とは異っており、推定配列のさらに69及び64アミノ酸上流に開始コドンであるATGがmRNA上で存在することを示している。この配列をコードするDNAを含むプラスミドによる形質転換体 *Escherichia coli* DH10B/phSLC1L8をIFOおよびNIBHに寄託した。

15

実施例9 MCHが誘起する、ラットSLC-1発現CHO細胞膜画分へのGTP γ S結合活性の測定

MCHのラットSLC-1発現CHO細胞膜画分に対する [³⁵S]-Guanosine 5'-(γ -thio)triphosphateの結合促進活性を以下の方法により測定した。最初に膜画分の調製法を記載する。1 x 10⁸個のCHO/SLC-1細胞に10mlのホモジネートバッファー(10mM NaHCO₃, 5mM EDTA, 0.5mM PMSF, 1 μ g/ml pepstatin, 4 μ g/ml E64, 20 μ g/ml leupeptin)添加し、ポリトロン(12,000 rpm, 1分間)を用いて破碎した。細胞破碎液を遠心(1,000 g, 15分間)して上清を得た。次にこの上清を超遠心分離(Beckman Type 30ローター, 30,000 rpm, 1時間)し、得られた沈殿物をラットSLC-1発現CHO細胞膜画分とした。

25

GTP γ S結合活性の測定は以下の通りである。ラットSLC-1発現CHO細胞膜

- 画分を膜希釈緩衝液 (50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 5mM MgCl_2 , 150mM NaCl , 1 μM GDP) で希釈して、タンパク質濃度 30 mg/ml のアッセイ用細胞膜画分溶液をつくる。アッセイ用膜画分溶液 200 μl に、51.5 nM 濃度の [^{35}S]-Guanosine 5'-(γ -thio) triphosphate (NEN 社) を 2 μl と種々の濃度の MCH (ペニンスラ社) を 2 μl 5
1 添加し、この混合液を 25 $^{\circ}\text{C}$ で一時間保温した。混合液をフィルター濾過し、さらにフィルターを洗浄用バッファー (50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 5mM MgCl_2 , 1mM EDTA, 0.1% BSA) 1.5 ml で 2 回洗浄した後、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。MCH は、用量依存的に、膜画分に結合する [^{35}S]-Guanosine 5'-(γ -thio) triphosphate 量を増大させた。また、約
10 0.5 nM 濃度の MCH は、最大結合の 50% の結合を誘起した。

実施例 10 ヒト胎児脳由来 cDNA を用いた PCR 法による ヒト SLC-1 cDNA の増幅

- ジントラップ法によりクローニングされた ヒト SLC-1 DNA 配列を含むプラスミドを鋳型とし、配列番号: 12 および 13 の合成 DNA プライマーと配列番号: 14 および 15 の合成 DNA プライマーを用いて PCR 法による増幅をそれぞれ
15 行なった。前者の増幅 DNA を ヒト SLC-1 (S) と、後者の増幅 DNA を ヒト SLC-1 (L) と命名した。合成 DNA プライマーは受容体蛋白に翻訳される領域の遺伝子が増幅されるように構築したが、その際に遺伝子の 5' 側に制限酵素 Sal I の認識する塩基配列が付加され、また 3' 側に制限酵素 Spe I の認識する塩基配列が付加さ
20 れるように、5' 側および 3' 側にそれぞれの制限酵素の認識配列を付加した。ヒト SLC-1 (S) 増幅の反応液の組成は、ヒト SLC-1 DNA 配列を含むプラスミド鋳型 5 μl 、合成 DNA プライマー各 0.4 μM 、0.2 mM dNTPs、pfuDNA ポリメラーゼ 0.5 μl および酵素に付属のバッファーで、総反応量は 50 μl とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー社) を用い、94 $^{\circ}\text{C}$ ・60 秒の加熱の後、94 $^{\circ}\text{C}$ ・60 秒、57 $^{\circ}\text{C}$ ・60 秒、72 $^{\circ}\text{C}$ ・150 秒のサイクルを 25 回繰り返し、最
25 後に 72 $^{\circ}\text{C}$ ・10 分保温した。また、ヒト SLC-1 (L) 増幅の反応液の組成は、ヒト SLC-1

- DNA配列を含むプラスミド鋳型5 μ l、合成DNAプライマー各0.4 μ M、0.2 mM dNTPs、pfuDNAポリメラーゼ0.5 μ lおよび酵素に付属のバッファーで、総反応量は50 μ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー社）を用い、94℃・60秒の加熱の後、94℃・60秒、60℃・60秒、72℃・3分のサイクルを25回繰り返し、最後に72℃・10分保温した。増幅産物の確認は、0.8%アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムブロマイド染色によって行なった。

実施例 1 1 PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入 10 cDNA部分の塩基配列の解読による増幅cDNA配列の確認

- 実施例 1 0で行なったPCR後の反応産物は0.8 %の低融点アガロースゲルを用いて分離し、バンドの部分のカミソリで切り出した後、細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なってDNAを回収した。PCR-Script™ Amp SK(+)クローニングキット（ストラタジーン社）の処方に
15 従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR-Script Amp SK(+)へサブクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 α competent cell（トイヨーボー）に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、ヒトSLC-1 (S)の形質転換体E. coli
20 DH5 α /hSLC-1 (S)とヒトSLC-1 (L)の形質転換体E. coli DH5 α /hSLC-1 (L)を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIA prep8 mini prep（キアゲン社）を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いて制限酵素Sal IおよびSpe Iによる切断を行ない、挿入されている受容体cDNA断片の大きさを確認した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy
25 Terminator Cycle Sequence Kit（パーキンエルマー社）を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。得られたクローンの配列は、ヒトSLC-1

遺伝子を鋳型として配列番号：12および13の合成DNAプライマーで増幅されるべきDNA配列（配列番号：16）およびヒトSLC-1遺伝子を鋳型として配列番号：14および15の合成DNAプライマーで増幅されるべきDNA配列（配列番号：17）にそれぞれ一致した。

5

実施例12 ヒトSLC-1(S)発現CHO細胞およびヒトSLC-1(L)発現CHO細胞の作製

実施例11で配列が確認されたヒトSLC-1(S)と、ヒトSLC-1(L)が導入されたプラスミドによって形質転換された*E. coli*のクローンよりPlasmid Midi Kit（キアゲン社）を用いてプラスミドを調製し、制限酵素Sal IおよびSpe Iで切断してインサート部分を切り出した。インサートDNAは電気泳動後、アガロースゲルからカミソリで切り出し、次に細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なって回収した。このインサートDNAをSal IおよびSpe Iで切断した動物細胞発現用ベクタープラスミドpAKKO-111H(Hinuma, S. et al. Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1219, pp. 251-259 (1994)記載のpAKKO1.11Hと同一のベクタープラスミド)に加え、T4ライゲース（宝酒造）を用いてライゲーションを行ない、蛋白発現用プラスミドpAKKO-hSLC-1(S)とpAKKO-hSLC-1(L)を構築した。

pAKKO-hSLC-1(S)およびpAKKO-hSLC-1(L)で形質転換した*E. coli* DH5 α （トヨーボー）を培養後、Plasmid Midi Kit（キアゲン社）を用いてpAKKO-hSLC-1(S)とpAKKO-hSLC-1(L)のプラスミドDNAを調製した。これをCellPfect Transfection Kit（アマシャムファルマシアバイオテク社）を用い添付のプロトコルに従ってCHO dhfr⁻細胞に導入した。10 μ gのDNAをリン酸カルシウムとの共沈懸濁液とし、24時間前に5 x 10⁵または1 x 10⁶個のCHO dhfr⁻細胞を播種した10 cmシャーレに添加した。10%ウシ胎児血清を含むMEM α 培地で1日間培養した後、継代し、選択培地である10%透析ウシ胎児血清を含む核酸不含MEM α 培地で培養した。選択培地中で増殖してくるヒトSLC-1(S) 遺伝子導入CHO細胞である形質転換細胞

のコロニー56クローンおよび、ヒトSLC-1(L) 遺伝子導入CHO細胞である形質転換細胞のコロニー61クローンを選択した。

5 実施例 1 3 ヒトSLC-1(S)およびヒトSLC-1(L) mRNAの発現量の高い遺伝子導入細胞株の選択

実施例 1 2 で樹立されたCHO/hSLC-1(S)株56クローンおよびCHO/hSLC-1(L)株61クローンのmRNAの発現量をCytostar T Plate (アマシャムファルマシアバイオテク社) を用い、添付のプロトコルに従って以下のように測定した。CHO/hSLC-1(S)株およびCHO/hSLC-1(L)株の各クローンをCytostar T Plateの各wellに 2.5×10^4 個ずつ播種して24時間培養した後、10%ホルマリンによって細胞を固定した。各wellに0.25% Triton X-100を添加して細胞の透過性をあげた後、 ^{35}S ラベルした配列番号: 18のriboprobeを加えてハイブリダイズさせた。20 mg/mlのRNaseAを各wellに加えて遊離のriboprobeを消化し、プレートをよく洗浄した後、ハイブリダイズしたriboprobeの放射活性をTopcounterで測定した。放射活性の高い株がmRNA発現量が高い。

実施例 1 4 MCHによるヒトSLC-1発現CHO細胞に対するcAMP合成抑制活性

合成MCH (ペニンスラ社) を種々の濃度に希釈し、ヒトSLC-1発現CHO細胞に対するcAMP合成抑制活性を以下に示す方法で測定した。実施例 1 3 で選択したヒトSLC-1発現CHO細胞であるCHO/hSLC-1(S)株あるいはCHO/hSLC-1(L)株を24穴プレートに 5×10^4 cell/wellで播種し、48時間培養した。細胞を0.2mM 3-イソブチルメチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)で洗浄した(以下、0.2mM 3-イソブチルメチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)を、反応用バッファーと呼ぶ)。その後0.5mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温した。反応用バッファーを除き、新たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加え

- 5 した後、種々の量のMCHと2 μ Mフォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファーを細胞に加え、37℃で24分間反応させた。100 μ lの20%過塩素酸を加えて反応を停止させ、次に氷上で1時間置くことにより細胞内cAMPを抽出した。抽出液中のcAMP量は、cAMP EIAキット（アマシャムファルマシアバイオテク）を用いて測定した。その結果、MCHは用量依存的にヒトSLC-1発現細胞の細胞内cAMP量を低下させた。

実施例15 MCHがヒトSLC-1発現CHO細胞に対して惹起するアラキドン酸代謝物放出活性

- 10 種々の濃度の合成MCH（ペニン斯拉社）が示すヒトSLC-1発現CHO細胞に対するアラキドン酸代謝物放出活性を以下の方法により測定した。実施例13で選択したヒトSLC-1発現CHO細胞であるCHO/hSLC-1(S)株あるいはCHO/hSLC-1(L)株を24穴プレートに5 x 10⁴ cell/wellで播種し、24時間培養後、[³H]アラキドン酸を0.25 μ Ci/wellとなるよう添加した。[³H]アラキドン酸添加16時間後、細胞を0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)で洗浄し、各wellに0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)に溶解した種々の濃度の合成MCH500 μ lを添加した。以降、0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)を反応用バッファーと呼ぶ。37℃で60分間インキュベートした後に、反応液400 μ lをシンチレーターに加え、反応液中に遊離した[³H]アラキドン酸代謝物の量をシンチレーションカウンターにより測定した。その結果、合成MCHは容量依存的にヒトSLC-1発現細胞に対してアラキドン酸代謝物放出活性を示した。

実験例16 ヒトSLC-1発現CHO細胞膜画分を用いたGTP γ S結合活性の測定

- 25 ヒトSLC-1発現CHO細胞膜画分を以下の方法により調製した。5 mM EDTA(エチレンジアミン四酢酸)を添加したリン酸緩衝生理食塩水(pH 7.4)にヒトSLC-1

発現CHO細胞(1×10^8 個)を浮遊させ、遠心した。細胞のペレットにホモジネートバッファー(10 mM NaHCO_3 、5 mM EDTA、pH 7.5)を10 ml加え、ポリトロンホモジナイザーを用いてホモジネートした。400×gで15分間遠心して得られた上清をさらに100,000×gで1時間遠心し、膜画分の沈澱物を得た。この沈澱物を2 mlの
 5 アッセイバッファー[50 mM Tris-HCl(pH 7.5)、1 mM EDTA、0.1% BSA(ウシ血清アルブミン)、10 mM MgCl_2 、100 mM NaCl、1mM GDP (グアノシン5'-ニリン酸)、0.25 mM PMSF(フェニルメチルスルホニルフルオライド)、1 $\mu\text{g/ml}$ ペプスタチン、20 $\mu\text{g/ml}$ ロイペプチン、10 $\mu\text{g/ml}$ フォスフォラミドン]に懸濁し、100,000×gで1時間遠心した。沈澱物として回収された膜画分を再び20 mlのア
 10 ャッセイバッファーに懸濁し、分注後 -80°C で保存し、使用の都度解凍して用いた。

GTP γ S結合活性の測定は以下の通り実施した。ポリプロピレン製の96穴プレートに、アッセイバッファーで希釈したヒトSLC-1発現CHO細胞膜画分173 μl を分注した後、種々の濃度のMCH(Bachem社製)を溶解したDMSO溶液2 μl 、および
 15 [^{35}S]-Guanosine 5'-(γ -thio) triphosphate(第一化学薬品 社製) 25 μl を同時に添加した(細胞膜終濃度: 20 $\mu\text{g/ml}$ 、[^{35}S]-Guanosine 5'-(γ -thio) triphosphate終濃度: 0.33nM)。この反応液を25℃で1時間、攪拌しながら反応させた後、グラスフィルター(GF-C)を用いて吸引ろ過し、さらに洗浄液(50mM Tris-HCl緩衝液 pH7.5) 300 μl で3回洗浄した。グラスフィルターに液
 20 体シンチレーターを50 μl 添加し、残った放射活性を液体シンチレーションカウンタで測定した。

MCHは、用量依存的に、ヒトSLC-1発現CHO細胞膜画分に結合する[^{35}S]-Guanosine 5'-(γ -thio) triphosphate量を増大させた。また、MCHのヒトSLC-1発現CHO細胞膜画分に対する ED_{50} 値は0.2 nMであった。

25

実施例 1 7 手動エドマン分解によるMCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、

MCH(5-19)、MCH(6-19)およびMCH(7-19) (配列番号：19-24) の調製

MCH 0.1 mg (シグマ社) を30 μ lの50%ピリジンに溶解し、1 μ lのフェニルイソチオシアネート (和光純薬) を加えて窒素置換した後、45℃に保温した。10分おきに攪拌して1時間を経過したところで保温を止め、窒素気流下で乾固した。

5 20 μ lのエタノールに再度溶解し、窒素気流下、次いで減圧下で溶媒を溜去して乾固した。反応生成物であるフェニルチオカルバモイル誘導体を20 μ lのトリフルオロ酢酸 (和光純薬) によって溶解し、窒素置換して45℃で20分間保温することによりペプチドのアミノ末端アミノ酸をアニリノチアゾリノン誘導体として切断した。窒素気流でトリフルオロ酢酸を除いた後、30 μ lの水および100

10 μ lの酢酸n-ブチルを加え、酢酸n-ブチルにより過剰な試薬およびアニリノチアゾリノン誘導体を抽出して除去した。酢酸n-ブチルによる抽出は3回繰り返した。アミノ末端が1残基短縮されたMCH(2-19)を含む水相を窒素気流下、次いで減圧下で乾固した。

この分解過程を1回のみ行なうことにより、アミノ末端の1残基のみが欠失したMCH(2-19)を得た。同様な分解過程を2回、3回、4回、5回あるいは6回繰り返すことにより、1残基ずつN末端のアミノ基が短縮されたMCH(3-19)、MCH(4-19)、MCH(5-19)、MCH(6-19)およびMCH(7-19)を得た。

15

上記の分解反応によって得られたMCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、MCH(5-19)、MCH(6-19)およびMCH(7-19)を次のように精製した後、質量分析およびアミノ酸分析によって構造の確認を行なった。以下にMCH(4-19)について詳細に述べるが、他の誘導体についてもほぼ同様の操作を行なった。得られたMCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、MCH(5-19)、MCH(6-19)およびMCH(7-19)の分析値を表1に示した。

20

表1 MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、MCH(5-19)、MCH(6-19)およびMCH(7-19)の質量分析値およびアミノ酸分析値

構造	質量 ($M+H^+$) 測定値 (理論値) 組成式	アミノ酸分析値 (残基数)
MCH(2-19)	(2272.1) $C_{101}H_{156}N_{29}O_{23}S_4$	D 1.90 (1), E 2.28 (1), P 1.32 (1), G 2.33 (1), V 1.76 (2), C n. d. (1), M 0.46 (2), L 2.0 (2), Y 0.50 (1), F 0.93 (1), R 1.98 (3)
MCH(3-19)	(2125.0) $C_{92}H_{147}N_{28}O_{22}S_4$	D 1.01 (1), E 1.05 (1), P 1.25 (1), G 1.02 (1), V 1.9 (2), C 0.30 (1), M 1.37 (2), L 2.0 (2), Y 0.20 (1), R 2.94 (3)
MCH(4-19)	(2010.0) $C_{88}H_{142}N_{27}O_{19}S_4$	E 1.04 (1), P 1.12 (1), G 1.02 (1), V 1.88 (2), C 0.34 (1), M 1.42 (2), L 2.0 (2), Y 0.23 (1), R 2.93 (3)
MCH(5-19)	(1878.9) $C_{83}H_{133}N_{26}O_{18}S_3$	E 1.51 (1), P 0.69 (1), G 2.16 (1), V 1.27 (2), C n. d. (1), M 0.38 (1), L 2.0 (2), Y 0.18 (1), R 1.80 (3)
MCH(6-19)	(1765.9) $C_{77}H_{122}N_{25}O_{17}S_3$	E 0.69 (1), P 0.79 (1), G 0.70 (1), V 1.21 (2), C 0.15 (1), M 0.50 (1), L 1.0 (1), Y 0.20 (1), R 1.84 (3)
MCH(7-19)	1609.2 (1608.8) $C_{71}H_{110}N_{21}O_{16}S_3$	E 0.90 (1), P 0.62 (1), G 1.03 (1), V 1.05 (2), C 0.07 (1), M 0.33 (1), L 1.0 (1), Y 0.15 (1), R 1.04 (2)

MCH(4-19)を以下のようにHPLCで精製した。Spheri-5 RP-18逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（ブラウンリー社、2.1 mm x 30 mm）にあらかじめA液（0.1%トリフルオロ酢酸）を流速300 μ l/minで流し、25℃にて平衡化した。反応産物は270 μ lの0.1%トリフルオロ酢酸に溶解し、1回50 μ lをカラムに打ち込んだ後、流速300 μ l/minを保ちながら、30分間かけてB液（0.1%トリフルオロ酢酸/70%アセトニトリル）濃度を70%まで上昇させた。溶出液を210 nmの吸光度でモニターし、ピークを手動で分取した。MCH(4-19)は17.1分に溶出した。1つの試験管に集めたMCH(4-19)を濃縮乾固し、100 μ lのDMSOに溶解した。

10 質量分析は日本電子JMS-HX110でLSIMS法にて行なった。即ち、プローブチップ上で1 μ lの3-ニトロベンジルアルコールとグリセロールが3:2からなるマトリクスと、1 μ lのサンプルとを混合し、イオン源に導入した。15 kVに加速されたセシウムイオンを照射し、生成した正二次イオンを10 kVに加速して検出器に導いた。

15 アミノ酸分析のための加水分解は、サンプル5 μ lをガラス管にとって減圧乾固し反応バイアルに入れ、その底部に6 N共沸塩酸（ピアス社、Sequenal Grade）200 μ lを入れ、ウォータース社Pico-Tagワークステーションを用いてウォータース社の推奨する方法に従って脱気後、110℃、24時間保温して行なった。

反応バイアル中の塩酸を真空ポンプにより減圧下除去した後、150 μ lの20 mM塩酸で試料を希釈し、分析バイアルに注入してアミノ酸分析装置にセットし、100 μ lを分析に供した。アミノ酸分析は日立L-8500高速アミノ酸分析計を用いて、オルトフタルアルデヒド試薬（和光純薬）を誘導体化反応に用いた蛍光分析法にて分析した。蛍光分析用緩衝液の調製法、反応液の調製法、分析条件は、L-8500アミノ酸分析計取り扱い説明書の記載に従った。ロイシンを基準としたときの測定値のモル比は表1に示したとおりである。

なお、MCHあるいはMCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)およびMCH(5-19)は実施

例24から実施例28に記載した固相合成法によっても調製することができる。

実施例 18 MCH、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)およびMCH(5-19)の非アイソトープボルトン-ハンター試薬による誘導体化

- 5 MCHおよび実施例17で得られたMCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、MCH(5-19)およびMCH(6-19)の非アイソトープボルトン-ハンター試薬による誘導体化を行なった。MCH(4-19)の誘導体化を例にして以下に述べる。

- ジメチルホルムアミド50 μ lに溶解したMCH(4-19) 1 nmolに非アイソトープボルトン-ハンター試薬である3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオン
10 酸N-スクシンイミジル (和光純薬) 100 nmolおよびN,N-ジイソプロピルエチルアミン (和光純薬) 100 nmolを加えて37℃で4時間反応させた。

- 反応混合物に0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリル450 μ lを加えてHPLCにより精製した。クロマトグラフィーの条件は以下のとおりである。カラムはWakosil-II 5C18HG (4.6 x 150 mm)で流速は毎分1.0 mlとした。溶出は
15 0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル水を用い、アセトニトリル濃度を2分間10%に保持した後、5分間で20%まで上昇させ、その後20分間に50%まで上昇させて行なった。MCH(4-19)の非アイソトープボルトン-ハンター試薬による誘導体である[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-Met¹⁴]-MCH(4-19)は22.9分に溶出され、手動によって分取した。MCHあるいはMCH(2-19)
20 、MCH(3-19)、MCH(5-19)およびMCH(6-19)についてもほぼ同様の操作によってN末端アミノ酸のアミノ基に3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル基を導入して誘導体化し、HPLCによって分取した。これらの誘導体を実施例17に記載した方法と同様にして酸加水分解した後、アミノ酸分析を行なった。結果を表2に示した。

表2 誘導体化MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、MCH(5-19)およびMCH(6-19)のアミノ酸分析値

構造	アミノ酸分析値 (残基数)
誘導体化 MCH(2-19)	D 1.01 (1), E 1.05 (1), P 0.86 (1), G 1.09 (1), V 1.69 (2), C n. d. (1), M 1.01 (2), L 2.0 (2), Y 0.27 (1), F 0.90 (1), R 2.59 (3)
誘導体化 MCH(3-19)	D 1.20 (1), E 1.58 (1), P 1.12 (1), G 2.07 (1), V 1.60 (2), C n. d. (1), M 0.94 (2), L 2.0 (2), Y 0.19 (1), R 2.24 (3)
誘導体化 MCH(4-19)	E 1.09 (1), P 1.46 (1), G 1.09 (1), V 1.83 (2), C n. d. (1), M 1.14 (2), L 2.0 (2), Y 0.27 (1), R 2.78 (3)
誘導体化 MCH(5-19)	E 1.10 (1), P 0.90 (1), G 1.34 (1), V 1.55 (2), C n. d. (1), M 0.32 (1), L 2.0 (2), Y 0.32 (1), R 2.28 (3)

5

実施例19 ラジオアイソトープ標識MCH(4-19)の作製

実施例17で調製したMCHのN末端アミノ酸3残基欠失体であるMCH(4-19)を、ボルトン-ハンター法でラジオアイソトープ標識した。チューブの中でベンゼンに溶解している $[^{125}\text{I}]$ -ボルトン-ハンター試薬 (3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオン酸N-スクシンイミジル) 9.25 MBq (0.11 nmol) (NENライフサイエンスプロダクツ社、81.4 TBq/mmol) に乾燥窒素ガスを吹き付けて、ベンゼンを溜去した。このチューブに、 $18\mu\text{l}$ の50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.5) と $1.5\mu\text{l}$ のジメチルスルフォキシドに溶解した2.3 nmolのMCH(4-19)と $0.5\mu\text{l}$ のジメチルスルフォキシドを添加し、よく混合した。混合液を 37°C で2時間保温した後、ボルトン-ハンター試薬によるMCH(4-19)の放射化誘導体である $[^{125}\text{I}]$ -[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-Met¹]-MCH(4-19) (構造式は上記(4)に記載)を逆相HPLCにより分取した。 $[^{125}\text{I}]$ -[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-Met¹]-MCH(4-19)は、ODSカラム (トーソー、

10

15

ODS-80TM (4.6 mm x 150 mm)) からアセトニトリル濃度43.6%付近に溶出した。

- 同様にして $[^{125}\text{I}]$ -ボルトシーハンター試薬を用いることによってN末端アミノ酸のアミノ基に $[^{125}\text{I}]$ -3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル基を導入してMCH、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(5-19)、MCH(6-19)およびMCH(7-19)のラジオアイソトープ誘導体(上記(1)~(3)、(5)~(7))を調製することができる。

実施例20 放射ヨード標識MCH、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、MCH(5-19)、MCH(6-19)およびMCH(7-19)の作製

- 10 アイソトープ標識MCH、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、MCH(5-19)、MCH(6-19)およびMCH(7-19)は以下のようにアミノ酸配列中のTyr¹³を放射ヨード化して作製することもできる。MCH(4-19)について例示するが、同様の方法によってMCH、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(5-19)、MCH(6-19)およびMCH(7-19)の放射ヨード化体を作製することができる。
- 15 MCH(4-19) 5 μg を25 μl の0.4 M酢酸ナトリウム(pH 5.6)に溶解し、これに200 ngのラクトパーオキシダーゼ(和光純薬製)を加えた後、1 mCiの $[^{125}\text{I}]$ -ヨウ化ナトリウム(アマシャムファルマシアバイオテク社)および200 ngの過酸化水素(10 μl)を加える。室温で10分間静置した後、さらに200 ngの過酸化水素(10 μl)を加えて10分間静置する。これをTSKgel ODS-80T₅カラム(4.6 mm x 20 25 cm、トーソー)を用いたHPLCによって精製し、 $[^{125}\text{I}]$ -標識MCH(4-19)を得る。

- 実施例21 MCH、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、MCH(5-19)、MCH(6-19)およびMCH(7-19)のGTP γ Sバインディングアッセイを用いたアゴニスト活性の測定

ラットSLC-1発現CHO細胞膜画分は以下の方法により調製した。5 mM EDTA (エ

チレンジアミン四酢酸) を添加したリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) にラット SLC-1発現CHO細胞 (1×10^8 個) を浮遊させ、遠心した。細胞のペレットにホモジネートバッファー (10 mM NaHCO_3 、5 mM EDTA、pH 7.5) を10 ml加え、ポリトロンホモジナイザーを用いてホモジネートした。400×gで15分間遠心して得られた上清をさらに100,000×gで1時間遠心し、膜画分の沈澱物を得た。この沈澱物を2 mlのアッセイバッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA、0.1% BSA (ウシ血清アルブミン)、10 mM MgCl_2 、100 mM NaCl、1 μ M GDP (グアノシン5'-ニリン酸)、0.25 mM PMSF (フェニルメチルスルホニルフルオリド)、1 μ g/ml ペプスタチン、20 μ g/ml ロイペプチン、10 μ g/ml フォスフォラミドン) に懸濁し、100,000×gで1時間遠心した。沈澱物として回収された膜画分を再び20 mlのアッセイ バッファーに懸濁し、分注後 -80℃で保存し、使用の都度解凍して用いた。

MCH、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、MCH(5-19)、MCH(6-19) およびMCH(7-19) のアゴニスト活性の測定は以下の通り実施した。ポリプロピレン製の96穴プレートに、アッセイバッファーで希釈したラットSLC-1発現CHO細胞膜画分173 μ l を分注した後、DMSO溶液で種々の濃度に希釈したMCH、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、MCH(5-19)、MCH(6-19) およびMCH(7-19) 溶液を2 μ l、および [^{35}S]-guanosine 5'-(γ -thio) triphosphate (第一化学薬品社製) を25 μ lを同時に添加した (細胞膜終濃度: 20 μ g/ml、[^{35}S]-guanosine 5'-(γ -thio) triphosphate 終濃度: 0.33 nM)。この反応液を25℃で1時間、攪拌しながら反応させた後、ガラスフィルター (GF-C) を用いて吸引ろ過し、さらに洗浄液 (50 mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.5) 300 μ lで3回洗浄した。ガラスフィルターに液体シンチレーターを50 μ l添加し、残った放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

MCH(6-19) およびMCH(7-19) のアゴニスト活性がMCHと比較して、それぞれ10倍 および200倍程度低下していたのに対し、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19) お

よびMCH(5-19)はMCHとほぼ同等のアゴニスト活性を示した(図7)。

実施例22 非アイソトープボルトン-ハンター試薬によって誘導体化されたMCH、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)およびMCH(5-19)のGTP γ Sバインディング
5 グアッセイを用いたアゴニスト活性の測定

実施例18で得られた非アイソトープボルトン-ハンター試薬によって誘導体化されたMCH、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)およびMCH(5-19)のアゴニスト活性を、実施例21と同様にGTP γ Sバインディングアッセイを用いて測定した。

誘導体化されたMCH、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)およびMCH(5-19)はMCH
10 と同様に用量依存的にヒトSLC-1発現CHO細胞膜画分に結合する $[^{35}\text{S}]$ -guanosine 5'-(γ -thio)triphosphate量を増大させ、非アイソトープボルトン-ハンター試薬によって誘導体化された各種MCHがアゴニスト活性を有することを確認した(図8)。図中、BH-MCH、BH-MCH(2-19)、BH-MCH(3-19)、BH-MCH(4-19)およびBH-MCH(5-19)はそれぞれ非アイソトープボルトン-ハンター試薬によって誘導
15 体化されたMCH、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)およびMCH(5-19)を示す。

実施例23 ボルトン-ハンター試薬を用いて作製した $[^{125}\text{I}]$ -標識MCH(4-19)を用いた受容体結合実験

実施例19でボルトン-ハンター試薬を用いて作製した $[^{125}\text{I}]$ -標識MCH(4-19)
20 (構造式は上記(4)に記載)およびヒトSLC-1発現CHO細胞から調製した細胞膜画分を用いて受容体結合実験を行なった。

ヒトSLC-1発現CHO細胞から実施例16に従って調製した細胞膜画分を、アッセイ用バッファー(25 mM Tris-HCl、1 mM EDTA(エチレンジアミン四酢酸)、0.1 % BSA(ウシ血清アルブミン)、0.25 mM PMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)、1 $\mu\text{g/ml}$ ペプスタチン、20 $\mu\text{g/ml}$ ロイペプチン、10 $\mu\text{g/ml}$ フ
25 オスフォラミドン、pH 7.5)で各種濃度に希釈後、96穴のプレートに173 μl ず

つ分注した。最大結合量 (TB) を測定するために、2 μ l の DMSO と、100 pM の [125 I]-標識 MCH (4-19) 25 μ l を、また、非特異的結合 (NSB) を測定するために、100 μ M MCH の DMSO 溶液 2 μ l と、100 pM の [125 I]-標識 MCH (4-19) 25 μ l を、膜画分溶液に添加した。25 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた後、ポリエチレンイミン処理したワットマンガラスフィルター (GF-C) を用いて反応液を吸引ろ過した。ろ過後、 γ -カウンターを用いてろ紙上に残った [125 I]-標識 MCH (4-19) の放射活性を測定した。図 9 に示すように、膜画分の濃度に依存した [125 I]-標識 MCH (4-19) の特異的な結合 (SB) が認められた。

また、膜画分濃度を 2.5 μ g/ml に設定して、阻害率 (%) から MCH の 50% 阻害濃度 (IC_{50} 値) を算出したところ、 IC_{50} 値は 0.2 nM であった (図 10)。

ラット SLC-1 発現 CHO 細胞から調製した膜画分と [125 I]-標識 MCH (4-19) を用いて同様の結合実験を行なうことができる。

実施例 24 MCH (Asp-Phe-Asp-Met-Leu-Arg-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp-Gln-Val) の製造

市販 Boc-Val-OCH₂-PAM 樹脂 (0.77 mmol/g resin) 0.5 mmol 分をペプチド合成機 ABI 430A の反応曹に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方法で Boc-Gln, Boc-Trp (CHO), Boc-Cys (MeBzl), Boc-Pro, Boc-Arg (Tos), Boc-Tyr (Br-Z), Boc-Val, Boc-Arg (Tos), Boc-Gly, Boc-Leu, Boc-Met, Boc-Cys (MeBzl), Boc-Arg (Tos), Boc-Leu, Boc-Met, Boc-Asp (OcHex), Boc-Phe, Boc-Asp (OcHex) を順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得る。この樹脂 0.6 g を p-クレゾール 2 g、1,4-ブタンジチオール 1.2 ml と共に無水弗化水素 10 ml 中、0 $^{\circ}$ C・60 分攪拌した後、弗化水素を減圧留去し、残留物へジエチルエーテルを加え沈殿を濾過する。この沈殿に 50% 酢酸水を加え抽出し、不溶部分を除き、抽出液を十分に濃縮後、50% 酢酸水で充填したセファデックス (商品名) G-25 カラム (2.0 x 80 cm) に付し、同溶媒で展開、主要画分を集め LiChroprep (商品名

- 5) RP-18を充填した逆相クロマトカラム (2.6 x 60 cm)に付け0.1% TFA水200 ml
で洗浄、0.1% TFA水300 mlと0.1% TFA含有40%アセトニトリル水300 mlを用いた
線型勾配溶出を行ない、主要画分を集め濃縮する。此れを約4 mlの酢酸に溶解
し、蒸留水で240 mlに希釈の後、アンモニア水を用いpH 7.5に調整し、緩やか
に空気を吹込み攪拌する。反応をHPLCで追跡し、SH体ペプチドのピークがすべ
てSS体に変化した事を確認後、酢酸を加え溶液のpHを3に調整し、上記
LiChroprep (商品名) RP-18カラムに吸着する。カラムを0.1% TFA水200 ml
で洗浄後、0.1% TFA水300 mlと0.1% TFA含有50%アセトニトリル水300 mlを用い
た線型勾配溶出を行ない、主要画分を集め、凍結乾燥し目的とするペプチドを
10 得る。

質量分析による(M+H)⁺ 2387.3 (理論値 2387.9)

HPLC溶出時間: 20.9分

カラム条件

カラム: Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 150 mm)

- 15 溶離液: A液-0.1% TFA含有10%アセトニトリル水、B液-0.1%TFA含有60%アセト
ニトリル水を用い、A/B: 20/80~80/20へ直線型濃度勾配溶出 (20分)
流速: 1.0 ml/分

- 実施例 2 5 Des-Asp¹-MCH (MCH(2-19), Phe-Asp-Met-Leu-Arg-Cys-Met-Leu-
20 Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp-Gln-Val)の製造

- 市販Boc-Val-OCH₂-PAM樹脂 (0.77 mmol/g resin) 0.5 mmol分をペプチド合成
機ABI 430Aの反応曹に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方法で
Boc-Gln, Boc-Trp(CHO), Boc-Cys(MeBzl), Boc-Pro, Boc-Arg(Tos), Boc-
Tyr(Br-Z), Boc-Val, Boc-Arg(Tos), Boc-Gly, Boc-Leu, Boc-Met, Boc-
25 Cys(MeBzl), Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Met, Boc-Asp(OcHex), Boc-Pheを順
に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得る。この樹脂を実施例 2 5 と同様に脱保

護、環化、精製を行い目的のペプチドを得る。

質量分析による $(M+H)^+$ 2272.3 (理論値 2272.1)

HPLC溶出時間：20.6分

カラム条件

5 カラム：Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 150 mm)

溶離液：A液－0.1% TFA含有10%アセトニトリル水、B液－0.1%TFA含有60%アセトニトリル水を用い、A/B：20/80～80/20へ直線型濃度勾配溶出 (20分)

流速：1.0 ml/分

10 実施例 26 Des-[Asp¹, Phe²]-MCH (MCH(3-19), Asp-Met-Leu-Arg-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp-Gln-Val)の製造

市販Boc-Val-OCH₂-PAM樹脂 (0.77 mmol/g resin) 0.5 mmol分をペプチド合成機ABI 430Aの反応曹に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方法で Boc-Gln, Boc-Trp(CHO), Boc-Cys(MeBzl), Boc-Pro, Boc-Arg(Tos), Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Val, Boc-Arg(Tos), Boc-Gly, Boc-Leu, Boc-Met, Boc-Cys(MeBzl), Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Met, Boc-Asp(OcHex)を順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得る。この樹脂を実施例24と同様に脱保護、環化、精製を行い目的のペプチドを得る。

質量分析による $(M+H)^+$ 2124.8 (理論値 2125.0)

20 HPLC溶出時間：19.2分

カラム条件

カラム：Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 150 mm)

溶離液：A液－0.1% TFA含有10%アセトニトリル水、B液－0.1%TFA含有60%アセトニトリル水を用い、A/B：20/80～80/20へ直線型濃度勾配溶出 (20分)

25 流速：1.0 ml/分

実施例 2 7 Des-[Asp¹, Phe², Asp³]-MCH (MCH(4-19), Met-Leu-Arg-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp-Gln-Val)の製造

市販Boc-Val-OCH₂-PAM樹脂 (0.77 mmol/g resin) 0.5 mmol分をペプチド合成機ABI 430Aの反応曹に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方法で
 5 Boc-Gln, Boc-Trp(CHO), Boc-Cys(MeBzl), Boc-Pro, Boc-Arg(Tos), Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Val, Boc-Arg(Tos), Boc-Gly, Boc-Leu, Boc-Met, Boc-Cys(MeBzl), Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Metを順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得る。この樹脂を実施例 2 4 と同様に脱保護、環化、精製を行い目的のペプチドを得る。

10 質量分析による (M+H)⁺ 2009.9 (理論値 2010.0)

HPLC溶出時間 : 17.9分

カラム条件

カラム : Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 150 mm)

溶離液 : A液-0.1% TFA含有10%アセトニトリル水、B液-0.1%TFA含有60%アセト

15 ニトリル水を用い、A/B : 20/80~80/20へ直線型濃度勾配溶出 (20分)

流速 : 1.0 ml/分

実施例 2 8 Des-[Asp¹, Phe², Asp³, Met⁴]-MCH (MCH(5-19), Leu-Arg-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp-Gln-Val-OH)の製造

20 市販Boc-Val-OCH₂-PAM樹脂 (0.77 mmol/g resin) 0.5 mmol分をペプチド合成機ABI 430Aの反応曹に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方法で
 Boc-Gln, Boc-Trp(CHO), Boc-Cys(MeBzl), Boc-Pro, Boc-Arg(Tos), Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Val, Boc-Arg(Tos), Boc-Gly, Boc-Leu, Boc-Met, Boc-Cys(MeBzl), Boc-Arg(Tos), Boc-Leuを順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得
 25 る。この樹脂を実施例 2 4 と同様に脱保護、環化、精製を行い目的のペプチドを得る。

質量分析による $(M+H)^+$ 1878.9 (理論値 1878.9)

HPLC溶出時間：17.4分

カラム条件

カラム：Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 150 mm)

- 5 溶離液：A液－0.1% TFA含有10%アセトニトリル水、B液－0.1%TFA含有60%アセトニトリル水を用い、A/B：20/80～80/20へ直線型濃度勾配溶出（20分）
流速：1.0 ml/分

(配列表フリーテキスト)

- 10 配列番号：1

配列に関する他の情報：第7番目および第16番目の2つのCys残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

配列番号：2

配列に関する他の情報：第7番目および第16番目の2つのCys残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

- 15

配列番号：19

配列に関する他の情報：第6番目および第15番目の2つのCys残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

配列番号：20

- 20 配列に関する他の情報：第5番目および第14番目の2つのCys残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

配列番号：21

配列に関する他の情報：第4番目および第13番目の2つのCys残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

- 25 配列番号：22

配列に関する他の情報：第3番目および第12番目の2つのCys残基は分子内ジ

スルフィド結合を形成している。

配列番号：23

配列に関する他の情報：第2番目および第11番目の2つのCys残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

5 配列番号：24

配列に関する他の情報：第1番目および第10番目の2つのCys残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

産業上の利用可能性

- 10 本発明のMCHもしくはその誘導体またはその塩およびSLC-1またはその塩を用いることを特徴とするMCHもしくはその誘導体またはその塩とSLC-1またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法は、食欲（摂食）増進剤の他、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞などの予防・治療薬などとして用いることができるSLC-1アゴニスト、抗肥満剤（薬）、食欲（摂食）調節剤などの他、過強陣痛、強直性子宮収縮、胎児仮死、子宮破裂、頸管裂傷、早産、Prader-Willi症候群などの予防・治療薬などとして用いることができるSLC-1アンタゴニストのスクリーニング方法として有用である。
- 15

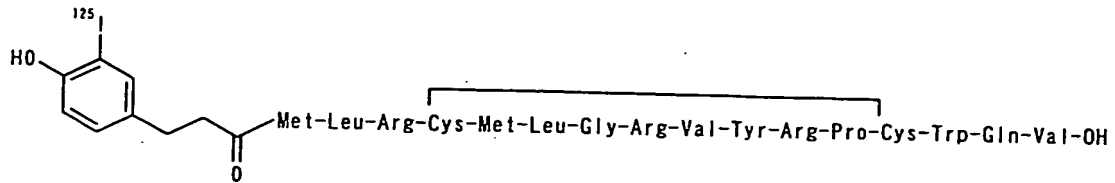
請求の範囲

1. メラニン凝集ホルモン(MCH)もしくはその誘導体またはその塩およびSLC-1またはその塩を用いることを特徴とするMCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
2. MCHもしくはその誘導体またはその塩およびSLC-1またはその塩を含有することを特徴とするMCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
3. 請求項1記載のスクリーニング方法または請求項2記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、MCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。
4. 請求項3記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。
5. 抗肥満薬である請求項4記載の医薬。
6. 配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。
7. 請求項6記載のタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。
8. MCHが配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドである請求項1記載のスクリーニング方法または請求項2記載のスクリーニング用キット。
9. 誘導体が配列番号：2で表されるアミノ酸配列のN末端から第5番目ないし第19番目の配列を含有するペプチドである請求項1記載のスクリーニング方法または請求項2記載のスクリーニング用キット。
10. 誘導体がボルトンハンター試薬により誘導されたMCHまたはボルトンハンター試薬により誘導された配列番号：2で表されるアミノ酸配列のN末端から第5番目ないし第19番目の配列を含有するペプチドである請求項1記載

のスクリーニング方法または請求項2記載のスクリーニング用キット。

11. ボルトンハンター試薬により誘導されたMCHもしくはボルトンハンター試薬により誘導された配列番号：2で表されるアミノ酸配列のN末端から第5番目ないし第19番目の配列を含有するペプチドまたはその塩。

5 12. 式



で表される化合物またはその塩。

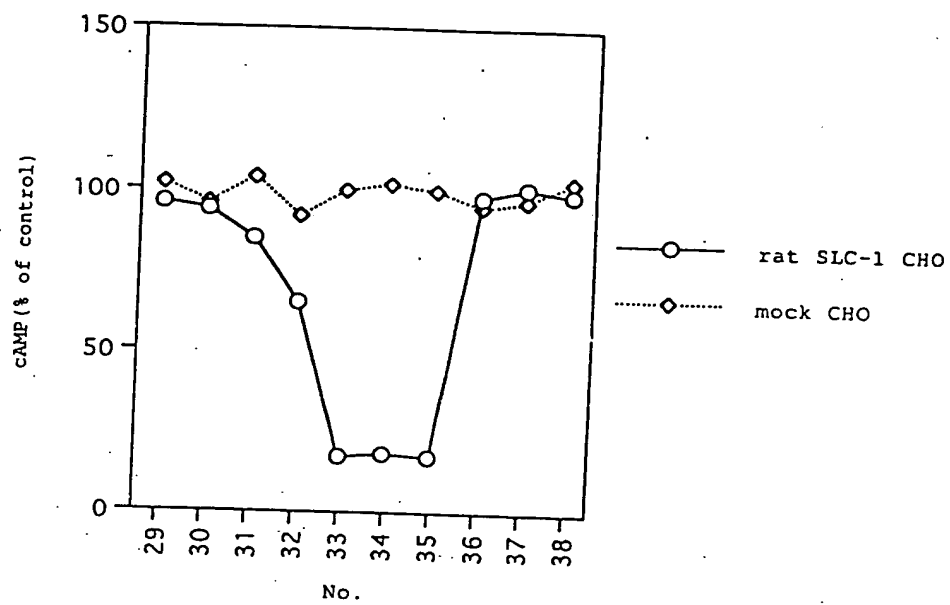
要 約 書

5 本発明はMCHもしくはその誘導体またはその塩およびSLC-1またはその塩を用いることを特徴とするMCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法などを提供する。

10 本発明のMCHもしくはその誘導体またはその塩およびSLC-1またはその塩を用いることを特徴とするMCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法は、食欲（摂食）増進剤の他、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞などの予防・治療薬などとして用いることができるSLC-1アゴニスト、抗肥満剤（薬）、食欲（摂食）調節剤などの他、過強陣痛、強直性子宮収縮、胎児仮死、子宮破裂、頸管裂傷、早産、Prader-Willi
15 ニストのスクリーニング方法として有用である。

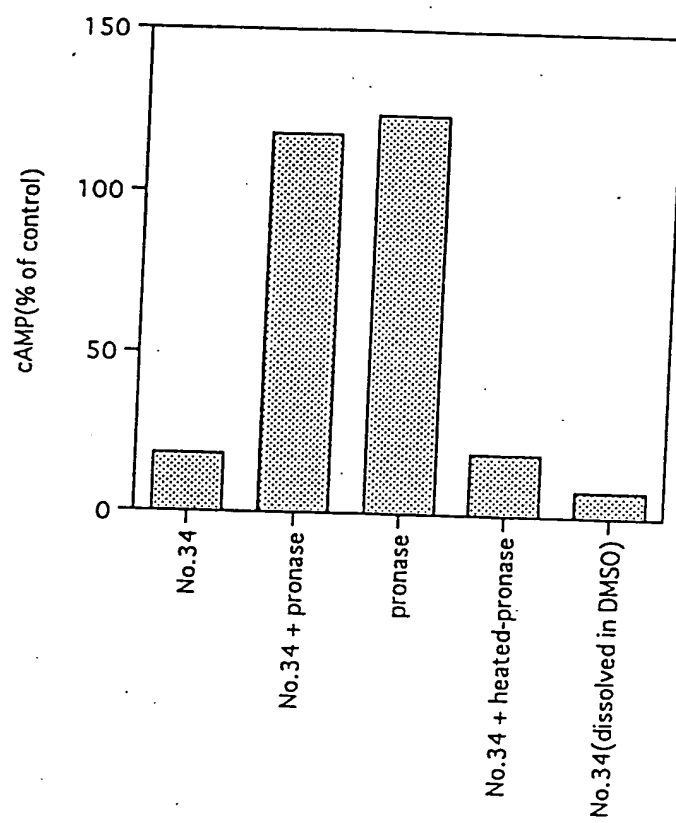


1





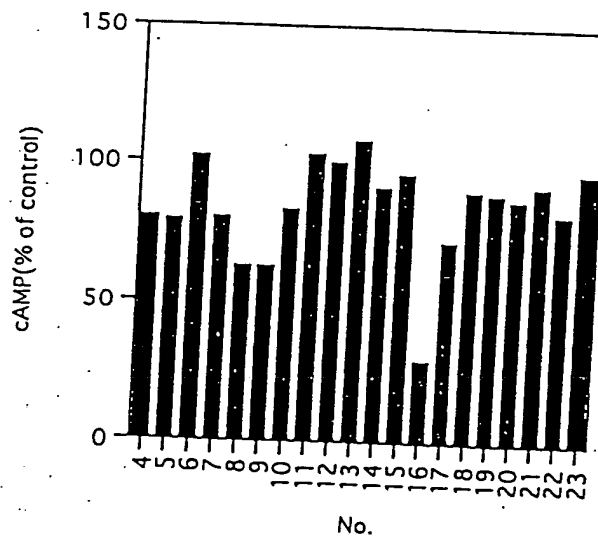
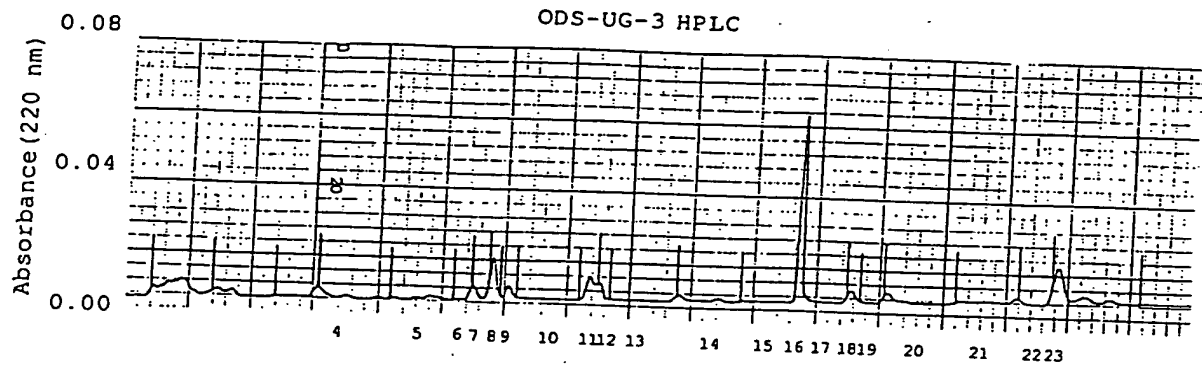
2



3/10

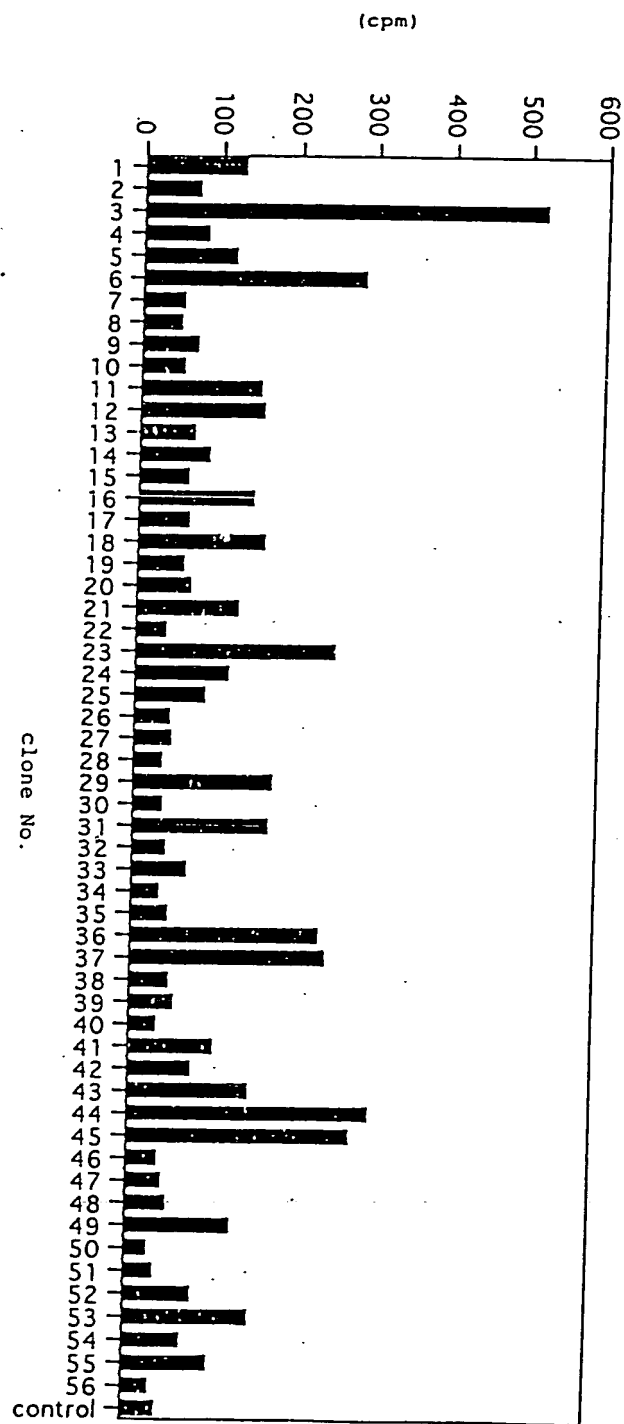


3



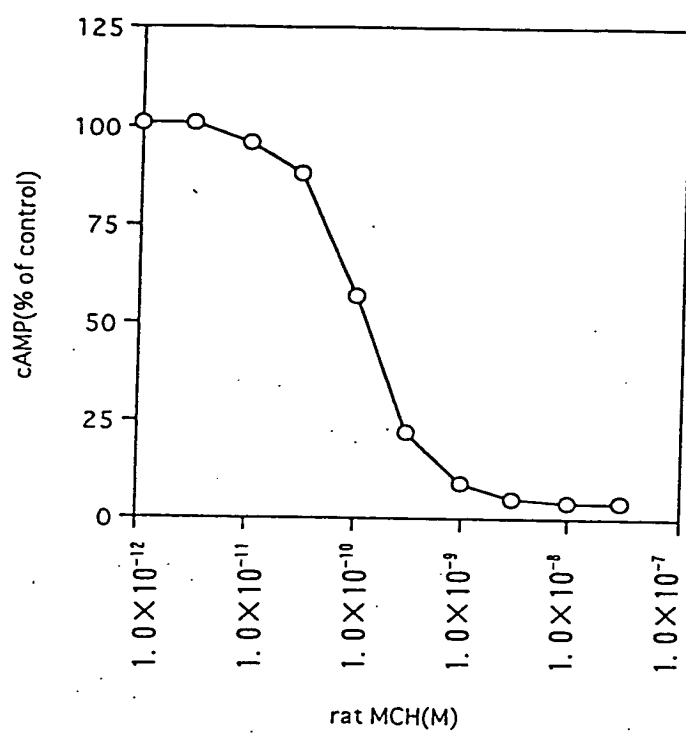


4





5



図

6

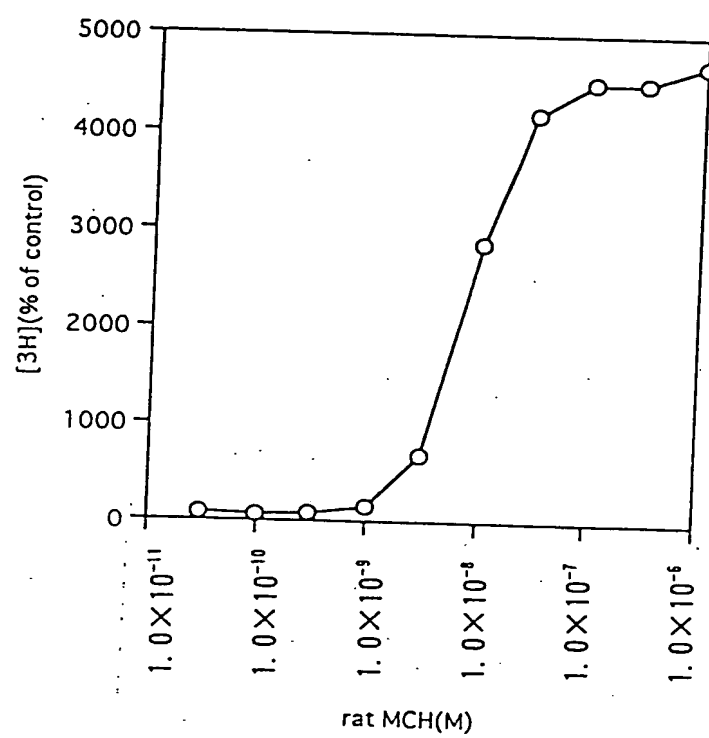


図 7

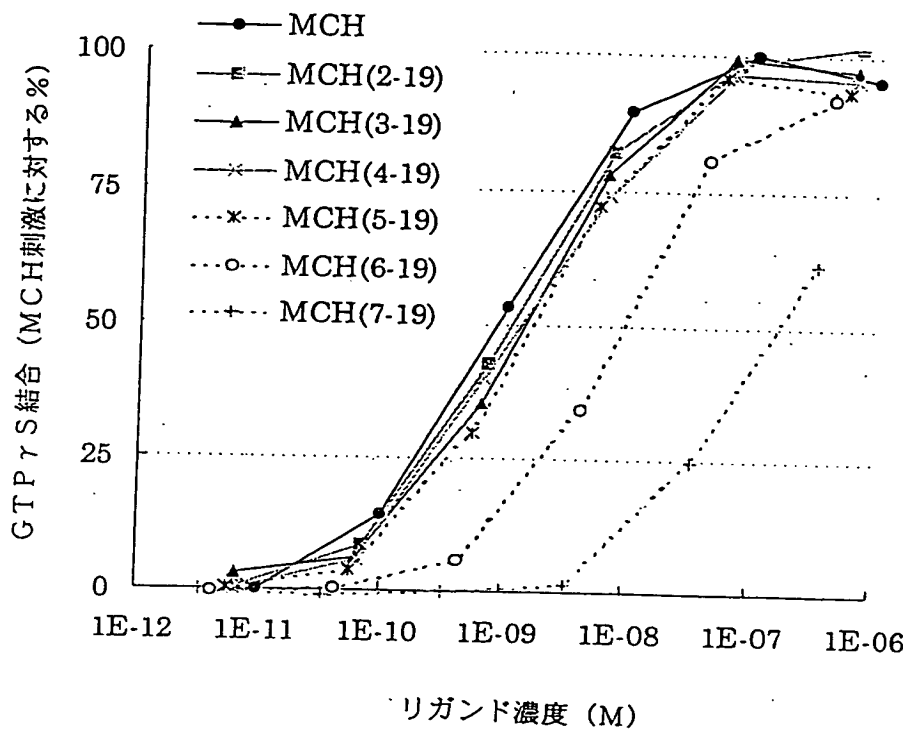
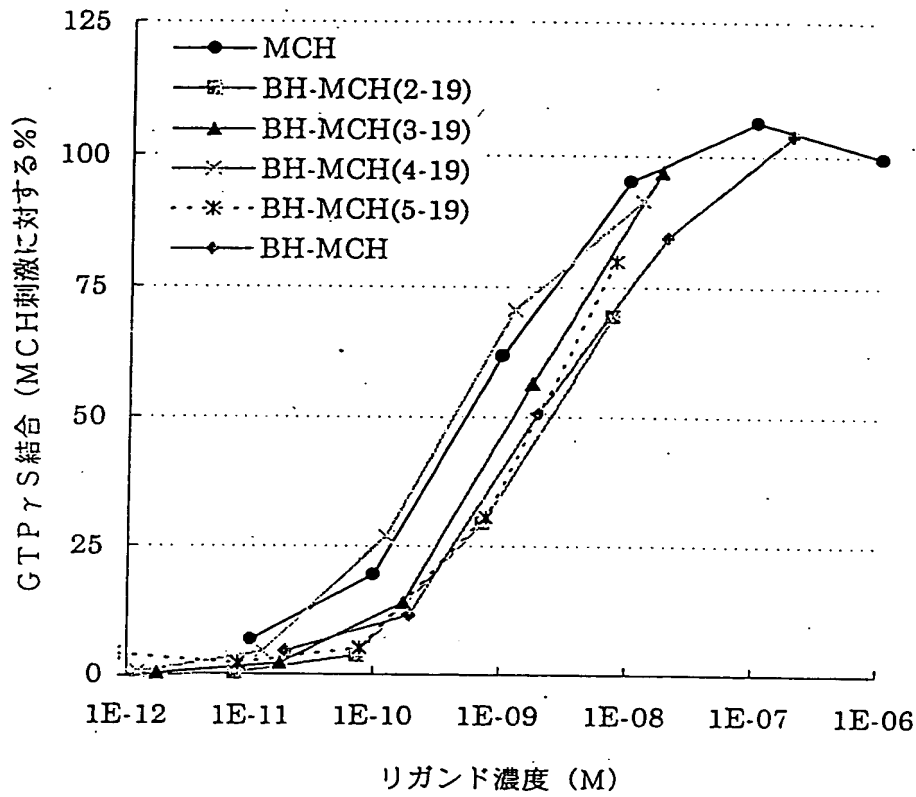
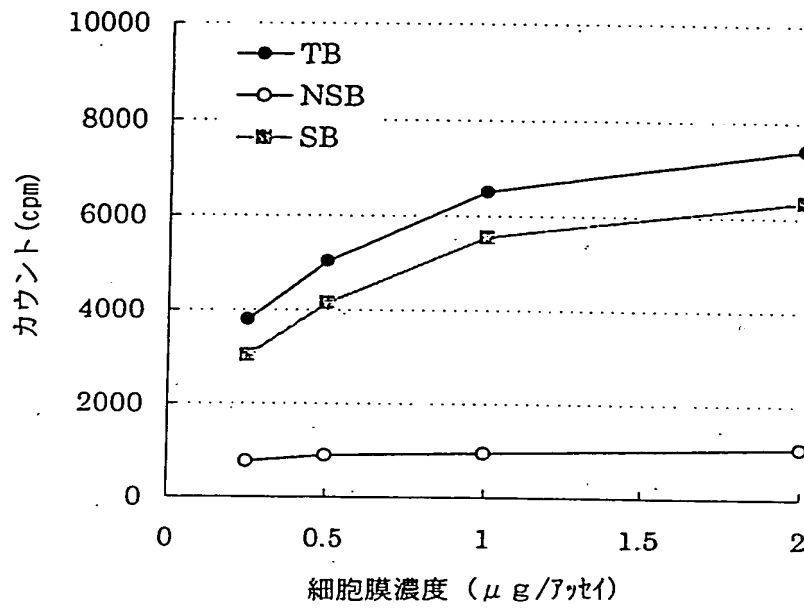


図 8



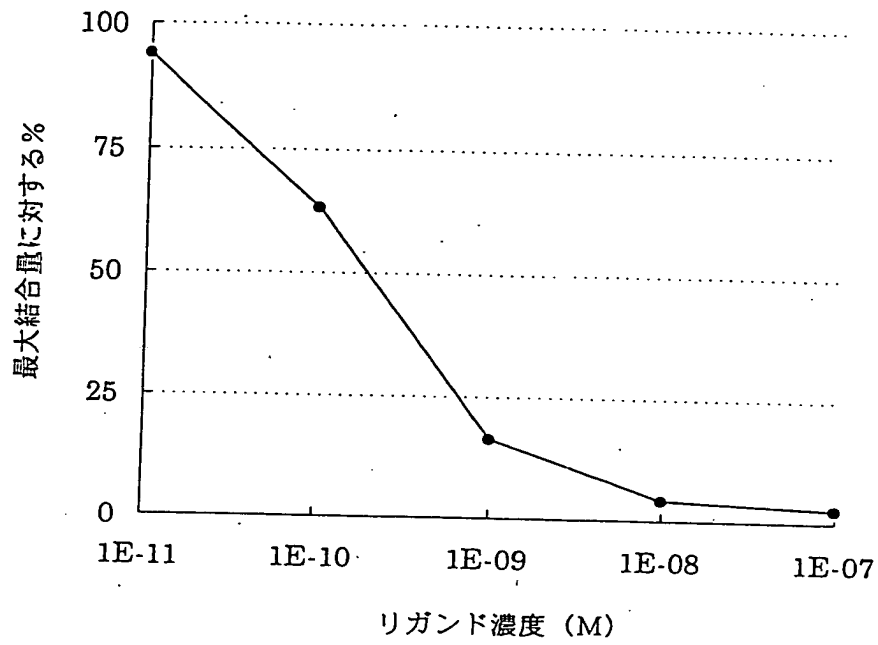
9/10

図 9



10/10

図 10



SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Screening Method

<130> 2601WOOP

<150> JP 10-374454

<151> 1998-12-28

<150> JP 11-122688

<151> 1999-04-28

<150> JP 11-249300

<151> 1999-09-02

<160> 24

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Rat

<223> The 7th cystein residue binds with the 16th cystein residue to form a intra-molecular disulfide-bond.

<400> 1

Asp Phe Asp Met Leu Arg Cys Met Leu Gly Arg Val Tyr Arg Pro Cys

1

5

10

15

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Rat

<223> The 7th cystein residue binds with the 16th cystein residue to form a intra-molecular disulfide-bond.

<400> 2

Asp Phe Asp Met Leu Arg Cys Met Leu Gly Arg Val Tyr Arg Pro Cys

1

5

10

15

Trp Gln Val

19

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 3

GTCGACATGG ATCTGCAAAC CTCGTTGCTG TG 32

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 4

ACTAGTTCAG GTGCCTTTGC TTTCTGTCCT CT 32

<210> 5

<211> 353

<212> PRT

<213> Rat

<400> 5

Met Asp Leu Gln Thr Ser Leu Leu Ser Thr Gly Pro Asn Ala Ser Asn

1

5

10

15

Ile Ser Asp Gly Gln Asp Asn Leu Thr Leu Pro Gly Ser Pro Pro Arg			
20	25	30	
Thr Gly Ser Val Ser Tyr Ile Asn Ile Ile Met Pro Ser Val Phe Gly			
35	40	45	
Thr Ile Cys Leu Leu Gly Ile Val Gly Asn Ser Thr Val Ile Phe Ala			
50	55	60	
Val Val Lys Lys Ser Lys Leu His Trp Cys Ser Asn Val Pro Asp Ile			
65	70	75	80
Phe Ile Ile Asn Leu Ser Val Val Asp Leu Leu Phe Leu Leu Gly Met			
85	90	95	
Pro Phe Met Ile His Gln Leu Met Gly Asn Gly Val Trp His Phe Gly			
100	105	110	
Glu Thr Met Cys Thr Leu Ile Thr Ala Met Asp Ala Asn Ser Gln Phe			
115	120	125	
Thr Ser Thr Tyr Ile Leu Thr Ala Met Thr Ile Asp Arg Tyr Leu Ala			
130	135	140	
Thr Val His Pro Ile Ser Ser Thr Lys Phe Arg Lys Pro Ser Met Ala			
145	150	155	160
Thr Leu Val Ile Cys Leu Leu Trp Ala Leu Ser Phe Ile Ser Ile Thr			
165	170	175	
Pro Val Trp Leu Tyr Ala Arg Leu Ile Pro Phe Pro Gly Gly Ala Val			
180	185	190	
Gly Cys Gly Ile Arg Leu Pro Asn Pro Asp Thr Asp Leu Tyr Trp Phe			
195	200	205	
Thr Leu Tyr Gln Phe Phe Leu Ala Phe Ala Leu Pro Phe Val Val Ile			
210	215	220	
Thr Ala Ala Tyr Val Lys Ile Leu Gln Arg Met Thr Ser Ser Val Ala			

225 230 235 240
 Pro Ala Ser Gln Arg Ser Ile Arg Leu Arg Thr Lys Arg Val Thr Arg
 245 250 255
 Thr Ala Ile Ala Ile Cys Leu Val Phe Phe Val Cys Trp Ala Pro Tyr
 260 265 270
 Tyr Val Leu Gln Leu Thr Gln Leu Ser Ile Ser Arg Pro Thr Leu Thr
 275 280 285
 Phe Val Tyr Leu Tyr Asn Ala Ala Ile Ser Leu Gly Tyr Ala Asn Ser
 290 295 300
 Cys Leu Asn Pro Phe Val Tyr Ile Val Leu Cys Glu Thr Phe Arg Lys
 305 310 315 320
 Arg Leu Val Leu Ser Val Lys Pro Ala Ala Gln Gly Gln Leu Arg Thr
 325 330 335
 Val Ser Asn Ala Gln Thr Ala Asp Glu Glu Arg Thr Glu Ser Lys Gly
 340 345 350

Thr

<210> 6

<211> 1074

<212> DNA

<213> Rat

<400> 6

GTCGACATGG ATCTGCAAAC CTCGTTGCTG TCCACTGGCC CCAATGCCAG CAACATCTCC 60
 GATGGCCAGG ATAATCTCAC ATTGCCGGGG TCACCTCCTC GCACAGGGAG TGTCTCCTAC 120
 ATCAACATCA TTATGCCTTC CGTGTTTGGT ACCATCTGTC TCCTGGGCAT CGTGGGAAAC 180
 TCCACGGTCA TCTTTGCTGT GGTGAAGAAG TCCAAGCTAC ACTGGTGCAG CAACGTCCCC 240
 GACATCTTCA TCATCAACCT CTCTGTGGTG GATCTGCTCT TCCTGCTGGG CATGCCTTTC 300
 ATGATCCACC AGCTCATGGG GAACGGCGTC TGGCACTTTG GGGAAACCAT GTGCACCCTC 360

ATCACAGCCA TGGACGCCAA CAGTCAGTTC ACTAGCACCT ACATCCTGAC TGCCATGACC 420
 ATTGACCGCT ACTTGGCCAC CGTCCACCCC ATCTCCTCCA CCAAGTTCCG GAAGCCCTCC 480
 ATGGCCACCC TGGTGATCTG CCTCCTGTGG GCGCTCTCCT TCATCAGTAT CACCCCTGTG 540
 TGGCTCTACG CCAGGCTCAT TCCCTTCCCA GGGGGTGCTG TGGGCTGTGG CATCCGCCTG 600
 CCAAACCCGG AACTGACCT CTACTGGTTC ACTCTGTACC AGTTTTTCCT GGCCTTTGCC 660
 CTTCCGTTTG TGGTCATTAC CGCCGCATAC GTGAAAATAC TACAGCGCAT GACGTCTTCG 720
 GTGGCCCCAG CCTCCAACG CAGCATCCGG CTTCGGACAA AGAGGGTGAC CCGCACGGCC 780
 ATTGCCATCT GTCTGGTCTT CTTTGTGTGC TGGGCACCCT ACTATGTGCT GCAGCTGACC 840
 CAGCTGTCCA TCAGCCGCCC GACCCTCAGG TTTGTCTACT TGTACAACGC GGCCATCAGC 900
 TTGGGCTATG CTAACAGCTG CCTGAACCCC TTTGTGTACA TAGTGCTCTG TGAGACCTTT 960
 CGAAAACGCT TGGTGTTGTC AGTGAAGCCT GCAGCCCAGG GGCAGCTCCG CACGGTCAGC 1020
 AACGCTCAGA CAGCTGATGA GGAGAGGACA GAAAGCAAAG GCACCTGAAC TAGT 1074

<210> 7

<211> 326

<212> RNA

<213> Rat

<400> 7

GCGAAUUGGG UACCGGGCCC CCCUCGAGG UCGACGGUUAU CGAUAAGCUU GAUAUCGAU 60
 UCCUGCAGCC CGGGGGAUCC GCCACUAGU UCAGGUGCCU UUGC UUUCUG UCCUCUCCUC 120
 AUCAGCUGUC UGAGCGUUGC UGACCGUGCG GAGCUGCCCC UGGGCUGCAG GCUUCACUGA 180
 CAACACCAAG CGUUUUCGAA AGGUCUCACA GAGCACUAUG UACACAAAGG GGUUCAGGCA 240
 GCUGUUAGCA UAGCCCAAGC UG 262

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 8

CAACAGCTGC CTCAACCC 18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 9

CCTGGTGATC TGCCTCCT 18

<210> 10

<211> 1275

<212> DNA

<213> Human

<400> 10

TAGGTGATGT CAGTGGGAGC CATGAAGAAG GGAGTGGGA GGGCAGTTGG GCTTGGAGGC 60
 GGCAGCGGCT GCCAGGCTAC GGAGGAAGAC CCCCTTCCCA ACTGCGGGGC TTGCGCTCCG 120
 GGACAAGGTG GCAGGCGCTG GAGGCTGCCG CAGCCTGCGT GGGTGGAGGG GAGCTCAGCT 180
 CGGTTGTGGG AGCAGGCGAC CGGCACTGGC TGGATGGACC TGGAAGCCTC GCTGCTGCCC 240
 ACTGGTCCCA ACGCCAGCAA CACCTCTGAT GGCCCCGATA ACCTCACTTC GGCAGGATCA 300
 CCTCCTCGCA CGGGGAGCAT CTCCTACATC AACATCATCA TGCCTTCGGT GTTCGGCACC 360
 ATCTGCCTCC TGGGCATCAT CGGGAACCTCC ACGGTCATCT TCGCGGTCGT GAAGAAGTCC 420
 AAGCTGCACT GGTGCAACAA CGTCCCCGAC ATCTTCATCA TCAACCTCTC GGTAGTAGAT 480
 CTCCTCTTTC TCCTGGGCAT GCCCTTCATG ATCCACCAGC TCATGGGCAA TGGGGTGTGG 540
 CACTTTGGGG AGACCATGTG CACCCTCATC ACGGCCATGG ATGCCAATAG TCAGTTCACC 600
 AGCACCTACA TCCTGACCGC CATGGCCATT GACCGCTACC TGGCCACTGT CCACCCCATC 660

TCTTCCACGA AGTTCCGGAA GCCCTCTGTG GCCACCCTGG TGATCTGCCT CCTGTGGGGC 720
 CTCTCCTTCA TCAGCATCAC CCCTGTGTGG CTGTATGCCA GACTCATCCC CTTCCCAGGA 780
 GGTGCAGTGG GCTGCGGCAT ACGCCTGCCC AACCCAGACA CTGACCTCTA CTGGTTCACC 840
 CTGTACCAGT TTTTCCTGGC CTTTGCCCTG CCTTTTGTGG TCATCACAGC CGCATACGTG 900
 AGGATCCTGC AGCGCATGAC GTCCTCAGTG GCCCCGCGCT CCCAGCGCAG CATCCGGCTG 960
 CGGACAAAGA GGGTGACCCG CACAGCCATC GCCATCTGTC TGGTCTTCTT TGTGTGCTGG 1020
 GCACCCTACT ATGTGCTACA GCTGACCCAG TTGTCCATCA GCCGCCCAGC CCTCACCTTT 1080
 GTCTACTTAT ACAATGCGGC CATCAGCTTG GGCTATGCCA ACAGCTGCCT CAACCCCTTT 1140
 GTGTACATCG TGCTCTGTGA GACGTTCCGC AAACGCTTGG TCCTGTCCGT GAAGCCTGCA 1200
 GCCCAGGGGC AGCTTCGCGC TGTCAGCAAC GCTCAGACGG CTGACGAGGA GAGGACAGAA 1260
 AGCAAAGGCA CCTGA 1275

<210> 11

<211> 422

<212> PRT

<213> Human

<400> 11

MeT Ser Val Gly Ala MeT Lys Lys Gly Val Gly Arg Ala Val Gly Leu
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Cys Gln Ala Thr Glu Glu Asp Pro Leu Pro Asn
 20 25 30
 Cys Gly Ala Cys Ala Pro Gly Gln Gly Gly Arg Arg Trp Arg Leu Pro
 35 40 45
 Gln Pro Ala Trp Val Glu Gly Ser Ser Ala Arg Leu Trp Glu Gln Ala
 50 55 60
 Thr Gly Thr Gly Trp MeT Asp Leu Glu Ala Ser Leu Leu Pro Thr Gly
 65 70 75 80
 Pro Asn Ala Ser Asn Thr Ser Asp Gly Pro Asp Asn Leu Thr Ser Ala

	85	90	95
Gly Ser Pro Pro Arg Thr Gly Ser Ile Ser Tyr Ile Asn Ile Ile MeT			
100	105	110	
Pro Ser Val Phe Gly Thr Ile Cys Leu Leu Gly Ile Ile Gly Asn Ser			
115	120	125	
Thr Val Ile Phe Ala Val Val Lys Lys Ser Lys Leu His Trp Cys Asn			
130	135	140	
Asn Val Pro Asp Ile Phe Ile Ile Asn Leu Ser Val Val Asp Leu Leu			
145	150	155	160
Phe Leu Leu Gly MeT Pro Phe MeT Ile His Gln Leu MeT Gly Asn Gly			
165	170	175	
Val Trp His Phe Gly Glu Thr MeT Cys Thr Leu Ile Thr Ala MeT Asp			
180	185	190	
Ala Asn Ser Gln Phe Thr Ser Thr Tyr Ile Leu Thr Ala MeT Ala Ile			
195	200	205	
Asp Arg Tyr Leu Ala Thr Val His Pro Ile Ser Ser Thr Lys Phe Arg			
210	215	220	
Lys Pro Ser Val Ala Thr Leu Val Ile Cys Leu Leu Trp Ala Leu Ser			
225	230	235	240
Phe Ile Ser Ile Thr Pro Val Trp Leu Tyr Ala Arg Leu Ile Pro Phe			
245	250	255	
Pro Gly Gly Ala Val Gly Cys Gly Ile Arg Leu Pro Asn Pro Asp Thr			
260	265	270	
Asp Leu Tyr Trp Phe Thr Leu Tyr Gln Phe Phe Leu Ala Phe Ala Leu			
275	280	285	
Pro Phe Val Val Ile Thr Ala Ala Tyr Val Arg Ile Leu Gln Arg MeT			
290	295	300	

Thr Ser Ser Val Ala Pro Ala Ser Gln Arg Ser Ile Arg Leu Arg Thr
 305 310 315 320
 Lys Arg Val Thr Arg Thr Ala Ile Ala Ile Cys Leu Val Phe Phe Val
 325 330 335
 Cys Trp Ala Pro Tyr Tyr Val Leu Gln Leu Thr Gln Leu Ser Ile Ser
 340 345 350
 Arg Pro Thr Leu Thr Phe Val Tyr Leu Tyr Asn Ala Ala Ile Ser Leu
 355 360 365
 Gly Tyr Ala Asn Ser Cys Leu Asn Pro Phe Val Tyr Ile Val Leu Cys
 370 375 380
 Glu Thr Phe Arg Lys Arg Leu Val Leu Ser Val Lys Pro Ala Ala Gln
 385 390 395 400
 Gly Gln Leu Arg Ala Val Ser Asn Ala Gln Thr Ala Asp Glu Glu Arg
 405 410 415
 Thr Glu Ser Lys Gly Thr
 420

<210> 12

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 12

GTCGACATGG ACCTGGAAGC CTCGCTGCTG C 31

<210> 13

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 13

ACTAGTTCAG GTGCCTTTGC TTTCTGTCCT C 31

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 14

AGTCGACATG TCAGTGGGAG CCATGAAGAA GGG 33

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 15

AACTAGTTCA GGTGCCTTTG CTTTCTGTCC TCT 33

<210> 16

<211> 1074

<212> DNA

<213> Human

<400> 16

GTCGACATGG ACCTGGAAGC CTCGCTGCTG CCCACTGGTC CCAACGCCAG CAACACCTCT 60

GATGGCCCCG ATAACCTCAC TTCGGCAGGA TCACCTCCTC GCACGGGGAG CATCTCCTAC 120
 ATCAACATCA TCATGCCTTC GGTGTTCTGGC ACCATCTGCC TCCTGGGCAT CATCGGGAAC 180
 TCCACGGTCA TCTTCGCGGT CGTGAAGAAG TCCAAGCTGC ACTGGTGCAA CAACGTCCCC 240
 GACATCTTCA TCATCAACCT CTCGGTAGTA GATCTCCTCT TTCTCCTGGG CATGCCCTTC 300
 ATGATCCACC AGCTCATGGG CAATGGGGTG TGGCACTTTG GGGAGACCAT GTGCACCCTC 360
 ATCACGGCCA TGGATGCCAA TAGTCAGTTC ACCAGCACCT ACATCCTGAC CGCCATGGCC 420
 ATTGACCGCT ACCTGGCCAC TGTCCACCCC ATCTCTTCCA CGAAGTTCCG GAAGCCCTCT 480
 GTGGCCACCC TGGTGATCTG CCTCCTGTGG GCCCTCTCCT TCATCAGCAT CACCCCTGTG 540
 TGGCTGTATG CCAGACTCAT CCCCTTCCCA GGAGGTGCAG TGGGCTGCGG CATA CGCCTG 600
 CCCAACCAG AACTGACCT CTACTGGTTC ACCCTGTACC AGTTTTTCCT GGCCTTTGCC 660
 CTGCCTTTTG TGGTCATCAC AGCCGCATAC GTGAGGATCC TGCAGCGCAT GACGTCCTCA 720
 GTGGCCCCCG CCTCCCAGCG CAGCATCCGG CTGCGGACAA AGAGGGTGAC CCGCACAGCC 780
 ATCGCCATCT GTCTGGTCTT CTTTGTGTGC TGGGCACCCT ACTATGTGCT ACAGCTGACC 840
 CAGTTGTCCA TCAGCCGCCC GACCCTCACC TTTGTCTACT TATACAATGC GGCCATCAGC 900
 TTGGGCTATG CCAACAGCTG CCTCAACCCC TTTGTGTACA TCGTGCTCTG TGAGACGTTT 960
 CGCAAACGCT TGGTCCTGTC GGTGAAGCCT GCAGCCCAGG GGCAGCTTCG CGCTGTCAGC 1020
 AACGCTCAGA CGGCTGACGA GGAGAGGACA GAAAGCAAAG GCACCTGAAC TAGT 1074

<210> 17

<211> 1283

<212> DNA

<213> Human

<400> 17

AGTCGACATG TCAGTGGGAG CCATGAAGAA GGGAGTGGGG AGGGCAGTTG GGCTTGGAGG 60
 CGGCAGCGGC TGCCAGGCTA CGGAGGAAGA CCCCCTTCCC AACTGCGGGG CTTGCGCTCC 120
 GGGACAAGGT GGCAGGCGCT GGAGGCTGCC GCAGCCTGCG TGGGTGGAGG GGAGCTCAGC 180
 TCGGTTGTGG GAGCAGGCGA CCGGCACTGG CTGGATGGAC CTGGAAGCCT CGCTGCTGCC 240
 CACTGGTCCC AACGCCAGCA ACACCTCTGA TGGCCCCGAT AACCTCACTT CGGCAGGATC 300

ACCTCCTCGC ACGGGGAGCA TCTCCTACAT CAACATCATC ATGCCTTCGG TGTTCCGGCAC 360
 CATCTGCCTC CTGGGCATCA TCGGGAATC CACGGTCATC TTCGCGGTCG TGAAGAAGTC 420
 CAAGCTGCAC TGGTGCAACA ACGTCCCCGA CATCTTCATC ATCAACCTCT CGGTAGTAGA 480
 TCTCCTCTTT CTCCTGGGCA TGCCCTTCAT GATCCACCAG CTCATGGGCA ATGGGGTGTG 540
 GCACTTTGGG GAGACCATGT GCACCCTCAT CACGGCCATG GATGCCAATA GTCAGTTCAC 600
 CAGCACCTAC ATCCTGACCG CCATGGCCAT TGACCGCTAC CTGGCCACTG TCCACCCCAT 660
 CTCTTCCACG AAGTTCCGGA AGCCCTCTGT GGCCACCCTG GTGATCTGCC TCCTGTGGGC 720
 CCTCTCCTTC ATCAGCATCA CCCCTGTGTG GCTGTATGCC AGACTCATCC CCTTCCCAGG 780
 AGGTGCAGTG GGCTGCGGCA TACGCCTGCC CAACCCAGAC ACTGACCTCT ACTGGTTCAC 840
 CCTGTACCAG TTTTTCCTGG CCTTTGCCCT GCCTTTTGTG GTCATCACAG CCGCATACGT 900
 GAGGATCCTG CAGCGCATGA CGTCCTCAGT GGCCCCCGCC TCCCAGCGCA GCATCCGGCT 960
 GCGGACAAAG AGGGTGACCC GCACAGCCAT CGCCATCTGT CTGGTCTTCT TTGTGTGCTG 1020
 GGCACCCTAC TATGTGCTAC AGCTGACCCA GTTGTCCATC AGCCGCCCCGA CCCTCACCTT 1080
 TGTCTACTTA TACAATGCGG CCATCAGCTT GGGCTATGCC AACAGCTGCC TCAACCCCTT 1140
 TGTGTACATC GTGCTCTGTG AGACGTTCCG CAAACGCTTG GTCCTGTGCG TGAAGCCTGC 1200
 AGCCCAGGGG CAGCTTCGCG CTGTCAGCAA CGCTCAGACG GCTGACGAGG AGAGGACAGA 1260
 AAGCAAAGGC ACCTGAACTA GTT 1283

<210> 18

<211> 420

<212> RNA

<213> Human

<400> 18

CAAAAGCUGG AGCUCCACCG CGGUGGCGGC CGCUCUAGCC CACUAGUUA GGUGCCUUUG 60
 CUUUCUGUCC UCUCUCGUC AGCCGUCUGA GCGUUGCUGA CAGCGCGAAG CUGCCCCUGG 120
 GCUGCAGGCU UCACCGACAG GACCAAGCGU UUGCGGAACG UCUCACAGAG CACGAUGUAC 180
 ACAAAGGGGU UGAGGCAGCU GUUGGCAUAG CCAAGCUGA UGGCCGCAU GUAUAAGUAG 240
 ACAAAGGUGA GGGUCGGGCG GCUGAUGGAC AACUGGGUCA GCUGUAGCAC AUAGUAGGGU 300

GCCCAGCACA CAAAGAAGAC CAGACAGAUG GCGAUGGCUG UGCGGGUCAC CCUCUUUGUC 360
 CGCAGCCGGA UGCUGCGCUG GGAGGCGGGG GCCACUGAGG ACGUCAUGCG CUGCAGGAUC 420

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> Rat

<223> The 6th cystein residue binds with the 15th cystein residue to form a intra-molecular disulfide-bond.

<400> 19

Phe Asp Met Leu Arg Cys Met Leu Gly Arg Val Tyr Arg Pro Cys Trp
 1 5 10 15

Gln Val

18

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Rat

<223> The 5th cystein residue binds with the 14th cystein residue to form a intra-molecular disulfide-bond.

<400> 20

Asp Met Leu Arg Cys Met Leu Gly Arg Val Tyr Arg Pro Cys Trp Gln
 1 5 10 15

Val

17

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

<213> Rat

<223> The 4th cystein residue binds with the 13th cystein residue to form a intra-molecular disulfide-bond.

<400> 21

Met Leu Arg Cys Met Leu Gly Arg Val Tyr Arg Pro Cys Trp Gln Val

1 5 10 15 16

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Rat

<223> The 3rd cystein residue binds with the 12th cystein residue to form a intra-molecular disulfide-bond.

<400> 22

Leu Arg Cys Met Leu Gly Arg Val Tyr Arg Pro Cys Trp Gln Val

1 5 10 15

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> Rat

<223> The 2nd cystein residue binds with the 11th cystein residue to form a intra-molecular disulfide-bond.

<400> 23

Arg Cys Met Leu Gly Arg Val Tyr Arg Pro Cys Trp Gln Val

1 5 10

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Rat

<223> The 1st cystein residue binds with the 10th cystein residue to form a intra-molecular disulfide-bond.

<400> 24

Cys Met Leu Gly Arg Val Tyr Arg Pro Cys Trp Gln Val

1

5

10